



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

**Estudo da Bioacessibilidade de Compostos  
Fenólicos Presentes em Extratos de *Prunus avium*  
L. Após Processo Digestivo *In Vitro*  
Experiência Profissionalizante na Vertente Comunitária,  
Hospitalar e Investigação**

**Rodrigo Carvalho Ramos**

Relatório de Estágio para Obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Farmacêuticas**  
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientadora: Professora Doutora Ana Paula Duarte  
Coorientadora: Professora Doutora Maria Eugenia Gallardo

**Covilhã, setembro de 2017**



## Dedicatória

*“Success is not final, failure is not fatal: it is the courage to continue that counts.”*

Winston Churchill

Aos meus pais, pela infinita dedicação, persistência e dedicação. Aos meus irmãos.

À minha tia Adélia, cujo exemplo prova que a resiliência é uma grande virtude.

À minha família, pelo apoio incondicional e ajuda crucial no seguimento dos estudos, sendo impossível não nomear o padrinho Bruno.

Aos amigos, que compreendem as ausências e apoiam nas vitórias e derrotas.



## Agradecimentos

À Professora Ana Paula Duarte pelo encorajamento, apoio e prontidão. Por ter aceite a condução deste desafio.

À Professora Eugenia Gallardo, que sem nunca me ter dado aulas, prestou incondicional apoio na realização da parte experimental deste trabalho. Por não hesitar quando ajuda é precisa.

Ao Professor Tiago, pelo rápido esclarecimento de dúvidas e simpatia constante.

À Catarina, por todo o teu contributo nesta caminhada que agora continuamos, para variar, juntos. Ramalheira, a melhor prenda do terceiro ano e Adriana, pela vossa paciência em aturar os meus devaneios. Capucho, por continuarmos juntos a caminhada no associativismo, pelo apoio e diversão constante. Marta e Gonçalo, obrigado por serem como são. Continuem ecléticos. Miguel e Inês, com o saudosismo dos tempos de Barcelona. Carmo, por poder sempre contar contigo, apesar de todas as minhas falhas. Miguel, o padrinho. Seguiste a minha caminhada de perto e apenas te tenho a agradecer, por tudo. Vânia, por nunca te ter visto sem ser a sorrir. Kel Damas e Pharmafia, obrigado. Afilhadas, Cláudia, Carolina e a mais pequenita Marina. Obrigado por tudo. O futuro da nossa Profissão está em boas mãos.

Aos colegas de turma, por me oferecerem a vossa confiança.

Obrigado *praxe*, por teres permitido tudo isto.

Gràcies Barcelona, per donar-me el millor any de la meva vida.

Obrigado UBI, por outros quatro incríveis anos.

À Farmácia Moderna, na pessoa da Dra. Octávia. Sei que tive o melhor estágio que podia ter.

Obrigado pela confiança depositada em mim.

Aos Serviços Farmacêuticos da ULS da Guarda. Obrigado Dr. Jorge pelos ensinamentos.

Daniela, Pedro, Sara, Janine por não falharem quando preciso mesmo, mesmo com a distância.

Ao UBIPharma e à APEF, pilares de muito do que sou hoje e de muitas amizades que conservo.

Catarina, Raquel e Diana, as minhas Presidentes.

Aos colegas do CICS-UBI, que sacrificando o seu tempo foram incansáveis no esclarecimento de dúvidas e questões levantadas com rapidez.

*A todos, um sincero obrigado.*



## Resumo

O presente relatório divide-se em três capítulos que pretendem descrever a experiência e funções desempenhadas durante o estágio em Farmácia Comunitária na Farmácia Moderna, sita na vila de Tortosendo, sob a direção técnica da Dra. Octávia Monteiro Vaz, nos Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins, sob a direção do Dr. Jorge Aperta, bem como o trabalho de investigação desenvolvido no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (Covilhã), sob a orientação da Professora Doutora Ana Paula Duarte e coorientação da Professora Eugenia Gallardo.

O Capítulo 1 descreve o trabalho de investigação realizado. A região do Fundão produz anualmente 7000 toneladas de cereja, o fruto de *Prunus avium L.*. Este é um importante motor da região, e o seu cultivo e comércio representam uma fração considerável da economia local. Apesar de se cultivarem diversas variedades nesta região, é particularmente conhecida a variedade *Saco*, uma cereja carnuda, com uma coloração vermelha escura e um sabor adocicado e agradável.

Os compostos fenólicos são um conjunto heterogêneo de metabolitos secundários das plantas, altamente diversificado e amplamente distribuído. Na verdade, são responsáveis por diversas características no fruto, nomeadamente o cheiro, cor, sabor e adstringência. A sua importância, porém, vai muito além destas importantes características. Estes compostos são conhecidos por estarem diretamente relacionados com muitas das propriedades promotoras de saúde associadas às cerejas. Múltiplos estudos têm demonstrado o poder antioxidante deste fruto, sendo-lhe atribuídas propriedades anticancerígenas, antimicrobianas, e anti-inflamatórias, bem como tendo um efeito protetor a nível cardiovascular e na prevenção e controlo da diabetes.

No entanto, e apesar de o valor nutritivo da cereja estar bem definido e estudado, a capacidades destes compostos estarem efetivamente disponíveis para absorção não havia sido estudada previamente. A digestão é um processo fisiologicamente muito agressivo. Os diversos passos que a constituem, seja pela influência química ou enzimática, provocam a deterioração de muitos dos compostos existentes, seja a nível farmacológico ou nutricional. O estudo da bioacessibilidade, a fração dum alimento que fica disponível para posterior absorção, e que resiste ao processo digestivo, torna-se necessário para compreender a real extensão da biodisponibilidade, sendo estes estudos indissociáveis.

Partindo de amostras de cereja liofilizada foi utilizado um protocolo de extração direcionado para compostos fenólicos, obtendo-se um extrato avermelhado para cada uma das variedades em estudo.

Foi desenvolvido e validado um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um detetor de fotiodos (HPLC-DAD), para a determinação de nove compostos fenólicos. Este método mostrou ser linear no intervalo de concentrações 2-50 µg/mL. Os restantes parâmetros analíticos se situaram dentro dos critérios estabelecidos pelas normas internacionais da *Food and Drug Administration*.

Através dum método digestivo simulado, com quantificação por HPLC-DAD no final de cada passo digestivo, salivar, gástrico e intestinal, foi possível compreender como respondem os compostos selecionados durante a digestão. Verificou-se que a maioria dos compostos fenólicos parece apresentar resistência ao processo digestivo, com exceção dos glicosídeos, nomeadamente a cianidina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-4'di-O-glicosídeo e a rutina, um rutinósido da quercetina. Paralelamente, as concentrações de quercetina e epicatequina mostraram aumentos consideráveis. É importante destacar que este é o primeiro trabalho que avalia a bioacessibilidade de compostos fenólicos em cerejas.

Por fim, e recorrendo ao mesmo método HPLC-DAD, foi comparado um conjunto de variedades oriundas da região do Fundão, *Saco*, colheita de 2015 e 2017, *Summit*, *Earlise*, *Brooks*, *Sweetheart* e *Primulat*. O estudo realizado permitiu quantificar os compostos fenólicos de cada uma destas variedades, tendo sido encontradas diferenças significativas. A variedade *Saco*, colheita de 2017, apresenta o maior teor em cianidina-3-O-glicosídeo, sendo esta uma das principais antocianinas das cerejas e grande responsável pela cor característica. No entanto, é a variedade *Primulat* que apresenta o maior teor de compostos fenólicos, pela aportação considerável de quercetina-3-4'di-O-glicosídeo. A variedade *Earlise* apresenta a menor quantidade de compostos fenólicos e também de cianidina-3-O-glicosídeo, o que também se reflete na coloração do próprio extrato.

Foi comparada a colheita de 2015 e 2017 da variedade *Saco*, tendo sido o teor de cianidina-3-O-glicosídeo a principal diferença encontrada, sendo várias vezes superior na colheita de 2017.

No Capítulo 2, encontram-se descritas as funções realizadas durante o estágio realizado entre janeiro e abril de 2017, incluindo todas as vicissitudes da prática farmacêutica. Por fim, o Capítulo 3 descreve a experiência obtida a nível de Farmácia Hospitalar, as tarefas do quotidiano e o conhecimento legislativo e normativo adquirido, concluindo assim a presente dissertação.

## Palavras Chave

Farmácia comunitária; Farmácia hospitalar; *Prunus avium* L.; bioacessibilidade; cromatografia; digestão *in vitro*; caracterização fenólica.

## Abstract

The presented dissertation is divided into three chapters, which intended to describe the experience and functions performed during the internship in Community Pharmacy, at Farmácia Moderna, in Tortosendo, under the technical direction of Mrs. Octávia Monteiro Vaz, PharmD; at the Pharmaceutical Services of the Hospital Sousa Martins, with the supervision of Mr. Jorge Aperta, PharmD, as well as the investigation undertaken at the Centre of Investigation in Health Sciences at the Faculty of Health Sciences of the University of Beira Interior (Covilhã), under the guidance of Professors Ana Paula Duarte, PhD and Eugenia Gallardo, PhD.

Chapter 1 describes the developed research. The region of Fundão produces annually 7000 metric tons of sweet cherry, the fruit of *Prunus avium L.*. This is an important engine of the region, and its production and trade represent an important fraction of the local economy. Although there are several cultivars in this region, it's particularly well known the *Saco* cultivar, a fleshy, deep red coloured cherry with a sweet and pleasant flavour.

Phenolic compounds are a wide and heterogeneous set of secondary metabolites in plants, highly diversified and broadly distributed. In fact, they are responsible for several characteristics in the fruit, namely the smell, colour, flavour and astringency. Its importance, however, goes far beyond these important characteristics. These compounds are known for being directly related with many of the health promoting capabilities associated with sweet cherries. Many studies have shown the antioxidant power of the fruit, being linked to anticancer, antimicrobial and anti-inflammatory capabilities, as well as a protective effect of the cardiovascular system and preventing and controlling diabetes.

However, and although the nutritional value of sweet cherry is rather well defined and studied, the possibility of these compounds being effectively available for absorption has not been previously studied. Digestion is a physiologically aggressive process. Its several steps, whether chemically or enzymatically, incite the degradation of many of the available compounds, both in pharmacology and nutrition. The study of bioaccessibility, the fraction of the food that is available for absorption and resists digestion is necessary to understand the real extent of bioavailability, making these studies indissociably intimate.

Starting with lyophilized sweet cherry samples, and using a phenolic compound directed extraction protocol, a red extract was obtained for each of the studied cultivars.

A high performance liquid chromatography method with a photodiode detector (HPLC-DAD) method was developed and validated to determine nine phenolic compounds. This method was linear between the 2-50 µg/mL. The remaining analytical parameters were within the international criteria defined by the *Food and Drug Administration*.

Through a simulated digestive method, with HPLC-DAD quantification at the end of each step, mouth, gastric and intestinal, it was possible to understand how the selected compounds respond during digestion. We noted that most of the selected phenolics resist the digestive process, except for the glucosides such as cyanidin-3-O-glucoside, quercetin-3-4'-di-O-glucoside and rutin, a quercetin rutoside. Quercetin and epicatechin concentration showed considerable increases. It's important to notice that this is the first work that evaluates the bioaccessibility of phenolic compounds in sweet cherries.

At last, and using the same HPLC-DAD method, we compared a set of Fundão's cultivars: *Saco*, harvest of 2015 and 2017, *Summit*, *Earlise*, *Brooks*, *Sweetheart* and *Primulat*. The performed study allowed to quantify the phenolic compounds of these cultivars, and we found significant differences between them. *Saco*, harvest of 2017, presented the largest content in cyanidin-3-O-glucoside, one of the major anthocyanins in sweet cherries and one of the main responsables for its colour. However, it's *Primulat* who presents the major content in total phenolics, mainly due to the content of quercetin-3-4'-di-O-glucoside. The cultivar with the least phenolic content is *Earlise*.

We compared *Saco*'s 2015 and 2017 harvests, and found that the content in cyanidin-3-O-glicoside was several time superior in the 2017 harvest.

Chapter 2 describes the obtained experience during the internship that took place between January and April 2017, including all the details of pharmacy practice. At last, Chapter 3 describes the acquired experience in hospital pharmacy, the daily tasks and the legislative and normative knowledge acquired, therefore concluding the present dissertation.

## **Keywords**

Community pharmacy; hospital pharmacy; *Prunus avium* L.; bioaccessibility; chromatography; *in vitro* digestion; phenolic characterization.

# Índice

<b>CAPÍTULO 1 - ESTUDO DA BIOACESSIBILIDADE DE COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM EXTRATOS DE <i>PRUNUS AVIUM L.</i> APÓS PROCESSO DIGESTIVO <i>IN VITRO.</i></b>	<b>1</b>
<b>I. Revisão Bibliográfica</b>	<b>1</b>
<b>1. Cereja - O Fruto de <i>Prunus avium L.</i></b>	<b>1</b>
1.1. Caracterização	1
1.2. Constituintes Bioquímicos e Aspectos Nutritivos da Cereja	1
1.3. Propriedades Atribuídas - Perspetiva Fitoterapêutica	2
<b>2. Compostos Fenólicos</b>	<b>3</b>
2.1. Caracterização Bioquímica	3
2.2. Extração a Partir do Fruto de <i>Prunus avium L.</i>	6
<b>3. Biodisponibilidade</b>	<b>8</b>
3.1. Contextualização Fisiológica	8
3.2. Biodisponibilidade <i>versus</i> Bioacessibilidade	10
3.3. Determinação da Bioacessibilidade e Biodisponibilidade	11
<b>4. Digestão <i>In Vitro</i></b>	<b>15</b>
4.1. Interesse e Contextualização	15
4.2. Seleção do Método para Processo Digestivo <i>in vitro</i>	17
<b>5. Metodologias de Análise e Quantificação de Componentes Bioativos</b>	<b>18</b>
<b>II. Parte Experimental</b>	<b>23</b>
<b>1. Preparação das amostras de cereja</b>	<b>23</b>
<b>2. Extração a partir do fruto liofilizado</b>	<b>23</b>
<b>3. Desenvolvimento e Validação do Método por HPLC-DAD Para a Quantificação de Compostos Fenólicos</b>	<b>24</b>
3.1. Reagentes e Condições	24
3.2. Validação do Procedimento Analítico	25
<b>4. Digestão <i>in vitro</i></b>	<b>30</b>
<b>5. Quantificação e Caracterização Através de HPLC-DAD</b>	<b>31</b>
5.1. Otimização do Processo de Diluição do Extrato Prévio à Quantificação dos Compostos Fenólicos em Amostras de Cereja	31

<b>III. Resultados e Discussão</b>	<b>33</b>
<b>1. Preparação do extrato de <i>Prunus avium L.</i></b>	<b>33</b>
1.1. Liofilização do Fruto de <i>Prunus avium L.</i>	33
1.2. Extração Metanólica do Fruto Liofilizado.	33
<b>2. Caracterização dos Compostos Fenólicos dos Extratos</b>	<b>34</b>
2.1. Seleção dos Compostos Fenólicos usados como padrão	34
2.2. Caracterização do Extrato de Seis Variedades de Cerejas do Fundão	36
<b>3. Caracterização dos Compostos Fenólicos Após Processo Digestivo</b>	<b>43</b>
3.1. Avaliação Global do Processo Digestivo	43
3.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos no Extrato Após o Processo Digestivo <i>in vitro</i>	44
<b>4. Conclusões e Perspetivas Futuras</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 2 - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA</b>	<b>55</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>55</b>
<b>2. Caracterização e Contextualização da Farmácia Moderna</b>	<b>56</b>
2.1. A Vila de Tortosendo - Localidade Pós-industrial	56
2.2. A Farmácia Moderna - História e Espaço Físico	57
2.3. Recursos Humanos, Equipamentos, Suporte Informático e Material Científico Disponível na Farmácia Moderna	59
<b>3. Medicamentos e demais Produtos de Saúde</b>	<b>60</b>
3.1. Definições e Nomenclaturas	60
3.2. Sistemas de Classificação Utilizados em Farmácia Comunitária	61
<b>4. Entrada no Circuito do Medicamento na Farmácia Moderna</b>	<b>63</b>
4.1. Realização de Encomendas	63
4.2. Receção de Encomendas	64
4.3. Armazenamento e Organização	65
4.4. Controlo de Prazo de Validade	65
4.5. Devoluções a Fornecedores	66
4.6. Entrega e reciclagem de medicamentos usados - VALORMED	66
<b>5. Dispensa de Medicamentos</b>	<b>67</b>
5.1. A Receita Médica - Breve Retrospectiva	67
5.2. Entidades, Protocolos, Sistemas de Participação e Complementaridade	68
5.3. Requisitos para a Dispensa, Validade, Caducidade e Veracidade da Receita Médica	70

5.4.	Situações Especiais de Dispensa - Psicotrópicos, Estupefacientes, Benzodiazepinas	71
<b>6.</b>	<b>Aconselhamento Farmacêutico e a Relação Deontológica Utente-Farmacêutico</b>	<b>71</b>
6.1.	Posicionamento Deontológico do Farmacêutico Comunitário	71
6.2.	Automedicação - Aconselhamento Farmacêutico	72
6.3.	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica Vs. Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica	73
6.4.	Dispensa de Outros Produtos de Saúde	73
<b>7.</b>	<b>Cuidados de Saúde e Serviços Oferecidos na Farmácia Moderna</b>	<b>74</b>
7.1.	Quantificações Bioquímicas	74
7.2.	Determinações Antropométricas	75
7.3.	Medição da Pressão Arterial	76
7.4.	Acompanhamento Nutricional	76
7.5.	Administração de Injetáveis	76
7.6.	Sistemas Personalizados de Dispensação	77
<b>8.</b>	<b>Preparação de Manipulados</b>	<b>77</b>
8.1.	Disposições Legais	77
8.2.	Matéria-Prima, Preparação e Garantia de Qualidade	78
8.3.	Documentação, Rotulagem e Dispensa do Medicamento Manipulado	79
<b>9.</b>	<b>Contabilidade e Gestão</b>	<b>79</b>
9.1.	Gestão Financeira	79
9.2.	Conferência do Receituário	81
9.3.	Faturação	82
9.4.	Relações Externas	83
9.5.	Arquivo Documental	83
<b>10.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>83</b>
<b>CAPÍTULO 3 - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA HOSPITALAR</b>		<b>85</b>
<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	<b>85</b>
<b>2.</b>	<b>Organização e Estrutura dos Serviços Farmacêuticos</b>	<b>85</b>
2.1.	Espaço Físico e Equipamentos	85
2.2.	Recursos Humanos	87
<b>3.</b>	<b>Circuito do Medicamento em Farmácia Hospitalar</b>	<b>88</b>
3.1.	Seleção e Aquisição	88
3.2.	Receção	90

3.3. Armazenamento	90
3.4. Distribuição	91
<b>4. Preparação e Controlo de Produtos Farmacêuticos</b>	<b>98</b>
4.1. Generalidades	98
4.2. Preparação de Citotóxicos	99
4.3. Farmacotecnia	100
4.4. Reembalagem em Dose Unitária	101
<b>5. Participação do Farmacêutico no Acompanhamento Clínico</b>	<b>101</b>
5.1. Visita Médica	101
5.2. Farmacovigilância	102
5.3. Participação em Comissões Técnicas do Hospital	102
5.4. Cuidado Farmacêutico	103
5.5. Prestação de Informação Relativa a Medicamentos	104
<b>6. Conclusão</b>	<b>104</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>113</b>
1. Anexo ao Capítulo I, II. Parte Experimental, 3.2.1. Seletividade	113

## Lista de Figuras

- Figura 1 Estrutura geral dos flavonoides.
- Figura 2 Exemplo de antocianidina. Cianidina.
- Figura 3 Principais fenóis identificados nas cerejas.
- Figura 4 Curva genérica para a biodisponibilidade de uma qualquer substância, por via oral e IV.
- Figura 5 Mecanismos de passagem celular.
- Figura 6 Cromatograma obtido para o padrão ácido clorogénico.  $\lambda=320$  nm, TR=8,05 min.
- Figura 7 Cromatograma obtido para o padrão ácido gálico.  $\lambda=280$  nm, TR=2,96 min.
- Figura 8 Cromatograma obtido para o padrão ácido p-coumárico.  $\lambda=320$  nm, TR=16,77 min.
- Figura 9 Cromatograma obtido para o padrão cianidina-3-O-glicosídeo.  $\lambda=520$  nm, TR=14,12 min.
- Figura 10 Cromatograma obtido para o padrão cianidina.  $\lambda=520$  nm, TR=26,81 min.
- Figura 11 Cromatograma obtido para o padrão epicatequina.  $\lambda=280$  nm, TR=12,31 min.
- Figura 12 Cromatograma obtido para o padrão quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo.  $\lambda=520$  nm, TR=15,92 min.
- Figura 13 Cromatograma obtido para o padrão quercetina.  $\lambda=360$  nm, TR=39,96 min.
- Figura 14 Cromatograma obtido para o padrão rutina.  $\lambda=360$  nm, TR=22,95 min.
- Figura 15 Cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  $\lambda=280$  nm.
- Figura 16 Cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  $\lambda=320$  nm.
- Figura 17 Cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  $\lambda=360$  nm.
- Figura 18 Cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  $\lambda=520$  nm.
- Figura 19 Apresentação esquemática do modelo experimental digestivo *in vitro*.
- Figura 20 Fruto de *Prunus avium* L., liofilizado, variedade *Primulat*.
- Figura 21 Fruto de *Prunus avium* L. fresco, variedade desconhecida.
- Figura 22 0,5 g de extrato do fruto da variedade *Saco*.
- Figura 23 cereja antes do início da extração.
- Figura 24 estrutura química dos compostos fenólicos estudados.
- Figura 25 estrutura química dos padrões selecionados.
- Figura 26 aspeto das soluções mãe de 0,05 g/mL, da esquerda para a direita: *Sweetheart*, *Earlise*, *Summit*, *Primulat*, *Brooks*, *Saco 2015*, *Saco 2017*.
- Figura 27 Comparação para cada composto das seis variedades em estudo. Valores em mg por 100 g de fruta fresca.

- Figura 28 Comparação direta entre as variedades *Saco*, colheita de 2017 e de 2015.
- Figura 29 Fluido simulado salivar.
- Figura 30 Fluido simulado gástrico.
- Figura 31 Fluido simulado duodenal.
- Figura 32 Fluido simulado biliar.
- Figura 33 Aspeto final do extrato dissolvido após digestão gástrica.
- Figura 34 Aspeto do extrato dissolvido após adição do fluido duodenal.
- Figura 35 Aspeto do extrato dissolvido após adição da solução bicarbonato 1M.
- Figura 36 Aspeto final do extrato dissolvido após digestão intestinal.
- Figura 37 Aspeto de cada um dos extratos após cada uma das etapas do processo de digestão.
- Figura 38 Gráficos correspondentes à quantificação *versus* tempo de cada um dos compostos em estudo.
- Figura 39 Comparação entre os diversos compostos.
- Figura 40 Gráficos correspondentes à quantificação *versus* tempo de cada um dos compostos em estudo.
- Figura 41 Comparação entre os diversos compostos; desvio padrão e etiqueta de dados omitida para simplificação.

## Lista de Tabelas

- Tabela 1 Classificação de compostos fenólicos.
- Tabela 2 Classificação de técnicas cromatográficas.
- Tabela 3 Dados relativos á linearidade dos analitos em estudo.
- Tabela 3 Resultados da quantificação a partir de calibradores padrão, média dos triplicados.
- Tabela 4 Quantidades pesadas para preparação dos fluidos digestivos.
- Tabela 5 Diluições efetuadas para a realização da análise.
- Tabela 6 Rendimento da liofilização das diferentes variedades.
- Tabela 7 Rendimento da extração de 6 variedades de cereja oriundas do Fundão.
- Tabela 8 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Primulat*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 9 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Summit*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 10 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Earlise*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 11 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Sweetheart*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 12 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Brooks*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 13 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Saco 2015*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 14 Identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Saco 2017*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.
- Tabela 15 Comparação entre os resultados obtidos e bibliografia publicada. Todos os valores expressos em mg por 100 g de fruta liofilizada.
- Tabela 16 Momentos de recolha de alíquotas durante o processo digestivo *in vitro*.
- Tabela 17 Listagem do material de laboratório de presença obrigatória.



## Lista de Acrónimos

ATC	<i>Anatomical Therapeutical Chemical</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CCF	Centro Conferência de Faturas
CFT	Comissão de Farmácia e Terapêutica
CV	Coeficiente de variação
CYP	Citocromo P450
DCI	Denominação Comum Internacional
DL	Decreto-Lei
ERM	Erro médio relativo
EUA	Estados Unidos da América
FCS-UBI	Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior
FM	Farmácia Moderna
FP	Farmacopeia Portuguesa
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Diode Array Detector</i>
HPLC-ECD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Electrochemical Detection</i>
HPLC-FLD	<i>High Performance Liquid Chromatography - Fluorescence Detection</i>
IMC	Índice de Massa Corporal
IV	Intra-venoso
LASA	<i>Look Alike Sound Alike</i>
LLOQ	<i>Lower Limit of Quantification</i>
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network.</i>
PPCIRA	Programa de Prevenção e Controlo de Infecção e Resistência Antimicrobiana
SF	Serviços Farmacêuticos
SNS	Serviço Nacional de Saúde
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SPMS	Serviços Partilhados do Ministério da Saúde
TNF-alfa	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TR	Tempo de Retenção
ULS	Unidade Local de Saúde
UV	<i>Ultra-violet</i>



# Capítulo 1 - Estudo da Bioacessibilidade de Compostos Fenólicos Presentes em Extratos de *Prunus Avium L.* Após Processo Digestivo *In Vitro*.

## I. Revisão Bibliográfica

### 1. Cereja - O Fruto de *Prunus avium L.*

#### 1.1. Caracterização

A cereja, fruto de *Prunus avium L.* pertencente à família *Rosaceae*, género *Prunus* e ao subgénero *Cerasus* é um fruto de pequena dimensão, arredondado, de cor carmim escura, relacionada com o elevado teor de antocianinas. É um fruto muito consumido em climas temperados, e no caso particular da região da Cova da Beira, em particular no concelho de Fundão, a produção é um motor importante da economia local. Neste concelho, perto de 400 produtores gerem mais de 2600 hectares de área plantada, numa tendência crescente, que originam uma produção anual de perto de 7000 toneladas anuais (1).

A nível mundial, os EUA são, de acordo com dados de 2014, os maiores produtores mundiais, seguidos pela Turquia (2). A maioria destina-se a consumo em fresco e uma menor percentagem para a indústria de processamento, para congelar, secar ou enlatar. O consumo médio é difícil de estimar, sendo afetado pela época do ano e pelo clima da região, como referido (3).

#### 1.2. Constituintes Bioquímicos e Aspetos Nutritivos da Cereja

A cereja é um fruto extremamente apetecido pelo inconfundível sabor doce e textura agradável. Estas características, e outras como a cor, aroma, adstringência, são o reflexo dos seus constituintes bioquímicos e função das diversas variedades de cereja, que podem apresentar diferenças significativas em termos químicos e organoléticos (4,5).

Previsivelmente, os macronutrientes mais abundantes são os hidratos de carbono, seguidos de proteínas. As cerejas apresentam um baixo teor de lípidos e o conteúdo energético é estimado em 58 kcal/100g de fruta fresca (6). Conhecem-se vários açúcares e ácidos

orgânicos simples na cereja, destacando-se a frutose, glucose, xilose e o sorbitol, sendo a glucose o mais abundante, podendo representar 44,71 g/kg de fruta fresca (6,7). Outros estudos indicam a presença de sacarose, estando esta presente em menor quantidade (8). Ácidos orgânicos como o málico, cítrico, xiquímico, fumárico, oxálico, succínico, tartárico e ascórbico estão presentes em quantidades identificáveis e a quantidade de ácido ascórbico foi relacionada com o estado de maturação da fruta aquando da análise (3,6,8,9). Apesar de os resultados entre os diversos estudos serem díspares, o ácido málico apresenta a concentração mais elevada. As diferenças entre as variedades são apreciáveis e nem todos os constituintes aqui referidos foram identificados em todos os estudos.

As cerejas são ricas em compostos fenólicos, os quais, pela importância que têm neste estudo, serão abordados especificamente abaixo.

### 1.3. Propriedades Atribuídas - Perspetiva Fitoterapêutica

A cereja, enquanto fruto de elevado valor nutricional, é por si só um excelente elemento a integrar na alimentação, como se verifica pelos seus constituintes já referidos. Os diversos componentes que apresenta demonstram potencial na prevenção do cancro, doenças cardiovasculares, diabetes e várias doenças inflamatórias, nomeadamente uma redução do *stress* oxidativo, inflamação tumoral, controlo de glucose (pelo relativamente reduzido índice glicémico) e inibição da produção de ácido úrico (5,10,11).

Conseguem-se distinguir vários fatores que influenciam o conteúdo nutricional da cereja e a biodisponibilidade dos componentes bioativos. Um trabalho recente de M. B. Catalão (12), realizado na FCS-UBI, comprovou que o estado de maturação da cereja implica uma significativa variação no conteúdo de compostos fenólicos, tendo também sido estudado o potencial antioxidante deste fruto. De forma geral, o teor em antocianinas, responsáveis em larga escala pela cor característica da cereja, aumenta com a maturação da cereja. A época de colheita apresenta, portanto, uma influência neste aspeto. Por outro lado, G. Silva (13) estudou o potencial anticancerígeno do extrato deste fruto em culturas celulares LNCaP e PC3, células androgeno-dependentes e androgeno-independentes, respetivamente, com resultados positivos.

Encontra-se uma boa quantidade de minerais nas cerejas, nomeadamente potássio, fósforo, cálcio e magnésico, que, contrastando com o baixo teor de sódio, faz deste fruto um bom elemento no controlo da hipertensão arterial. Já o teor de fibra, embora satisfatório, não se encontra em quantidade suficiente para poder ser considerado como benéfico, no consumo de uma quantidade razoável de cereja (6,14).

Relativamente a compostos bioativos, distinguem-se nas cerejas dois grandes grupos: carotenoides, com elevada quantidade de beta-caroteno e compostos fenólicos com elevado teor em ácidos fenólicos e flavonoides. Uma mais aprofundada revisão à química e características de compostos fenólicos, pela elevada pertinência e importância para este trabalho, pode ser encontrada no subcapítulo 2.

Graças à elevada percentagem de compostos fenólicos, vitaminas, minerais e outros compostos bioativos, a cereja tem sido associada à prevenção do cancro, particularmente devido à quantidade de antocianinas presente, nomeadamente glicosídeos da cianidina. Este constituinte é conhecido também pelas suas propriedades antioxidantes. Outros estudos referem uma redução do *stress* oxidativo a nível do tecido cardíaco, com redução da inflamação vascular e redução indireta da formação de placas ateroscleróticas. Dada a associação do *stress* oxidativo com várias das complicações da diabetes, é possível extrapolar que os vários mecanismos de proteção podem ser estendidos a esta doença. Por outro lado, as antocianidinas podem estar envolvidas numa diminuição da resistência à insulina e estudos em ratos com dietas enriquecidas em *Prunus cerasus L.* encontraram níveis reduzidos de triglicéridos, colesterol, insulina e outros marcadores de *stress* oxidativo. Os processos inflamatórios, transversais à maioria das patologias humanas, têm sido alvo de diversos estudos envolvendo cerejas ou compostos presentes em cerejas. Verifica-se que há uma inibição da ciclooxigenase, a enzima responsável pela resposta inflamatória. Um estudo de sobrealimentação de antocianidinas, em ratos, encontrou uma redução dos níveis de TNF-alfa, quando comparado com o grupo de alimentação normal, sendo que, no entanto, seria necessário um consumo de uma quantidade inacreditável de antocianidinas para se obter este efeito. Os flavonoides e procianidinas encontrados nas cerejas podem reduzir o *stress* oxidativo e reduzir a formação de placas beta-amiloides, constituindo uma forma indireta de redução do risco de doença de Alzheimer (10,11,15-20).

Um outro composto de particular interesse encontrado e identificado em quantidade apreciável na cereja é a melatonina, cujo papel na regulação do ciclo circadiano e, portanto, como ajudante na insónia, sobretudo quando associada ao *jet lag*, está bem documentado. Um trabalho de 2015, de I. Henriques (21), FCS-UBI, encontrou e quantificou, recorrendo a cromatografia de líquidos acoplada a um detetor electroquímico, (HPLC-ECD), este composto em 5 variedades de cerejas oriundas da Cova da Beira.

## 2. Compostos Fenólicos

### 2.1. Caracterização Bioquímica

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários das plantas, sendo considerados um dos mais extensos grupos de fitoquímicos existente. Como referido, existem múltiplas propriedades promotoras de saúde associadas a este grupo. Em parte, podemos atribuir a

riqueza de propriedades à enorme variedade estrutural e química que este grupo apresenta. Estão documentados mais de 10000 compostos fenólicos. A sua presença e variedade é notória: são responsáveis por aspetos tão diferentes como a cor, sabor, aroma e adstringência (22).

Nos compostos fenólicos podemos identificar, pelo menos, um anel aromático com um grupo hidroxilo. Geralmente estão associados a açúcares, na forma conjugada, sendo a glucose o mais frequente destes. Pela referida complexidade estrutural, a sua classificação torna-se extremamente complicada. No trabalho de Vermerris e Nicholson (15), *Phenolic Compound Biochemistry*, encontramos citado o estudo de Harbone e Simmonds (23), classificando os compostos fenólicos pelo número de carbonos da molécula. Embora não satisfaça todos os requisitos de classificação, nem seja a forma mais prática de classificação, esta é efetivamente uma classificação empírica e aplicável aos compostos conhecidos e que ainda se venham a identificar. Outras formas de classificação existem.

Assim sendo, e de acordo com Harbone e Simmonds (23), os compostos fenólicos são classificados de acordo com a seguinte tabela, tabela 1.

Tabela 1: classificação de compostos fenólicos. Adaptado (15).

Estrutura Química	Classe
C <sub>6</sub>	Fenóis simples
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos cinâmicos, aldeídos cinâmicos, álcoois cinâmicos
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Coumarinas, isocoumarinas e cromonas
C <sub>15</sub>	Chalconas, auronas, dihidrochalconas
C <sub>15</sub>	Flavanos
C <sub>15</sub>	Flavonas
C <sub>15</sub>	Flavanonas
C <sub>15</sub>	Flavanois
C <sub>15</sub>	Antocianidinas
C <sub>15</sub>	Antocianinas
C <sub>30</sub>	Biflavonois
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Benzofenonas, xantonas, estilbenos
C <sub>6</sub> -C <sub>10</sub> -C <sub>14</sub>	Quinonas
C <sub>18</sub>	Betacianinas
Lignanós, neolignanós	Dímeros ou oligómeros
Lignina	Polímeros
Taninos	Oligómeros ou polímeros
Flobafenos	Polímeros

É importante ter em consideração que a elevada variedade estrutural leva a que estes compostos possuam uma miríade de subgrupos que dificultam a classificação. O facto de se verificarem interações entre os compostos, por vezes com resultados sinérgicos interessantes, dificulta ainda mais a tarefa.

De particular relevância para o estudo em questão encontramos os flavonoides e dentro destes as antocianidinas, pela proeminência e distribuição em cerejas. Os flavonoides são compostos com 15 átomos de carbono, detentores de uma estrutura geral  $C_6-C_3-C_6$ , que consiste em dois anéis aromáticos unidos por um heterociclo de 3 carbonos oxigenado, como visto na figura 1. Nas plantas, são geralmente encontrados na forma de glicosídeos conjugados (24). Verifica-se que podemos dividir os flavonoides em 13 subgrupos diferentes, encontrando-se elevadas variações estruturais dependendo do nível de hidrogenação dos anéis aromáticos. Os flavonoides representam importantes componentes da dieta humana e são simultaneamente os elementos mais frequentes e também os mais estudados (25). Devido à sua estrutura química, constituem um grupo com um elevado potencial antioxidante.

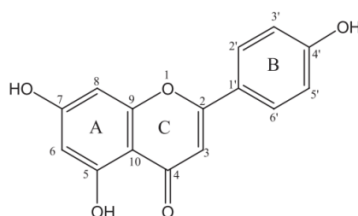


Figura 1: estrutura geral dos flavonoides. Adaptado (15).

Como referido, um dos mais relevantes grupos de flavonoides são as antocianidinas. Enquanto que os flavonoides em geral são incolores, as antocianidinas são as principais responsáveis pelas garridas cores de frutos e flores e também pela cor vermelha carmin que a cereja apresenta. As antocianidinas apresentam-se como glicosídeos e estruturalmente partilham com os demais flavonoides os mesmos 3 anéis, como indicado na figura 2. As antocianinas são os glicosídeos solúveis em água das antocianidinas (15). As suas características químicas fazem destes compostos poderosos antioxidantes. São transversais a todo o reino vegetal devido à sua coloração. São bastante prevalentes na alimentação e possuem várias características benéficas na promoção da saúde, maioritariamente devido ao poder antioxidante. São compostos fotossensíveis e facilmente degradáveis a temperaturas elevadas. A sua extração é facilitada em meio ácido.

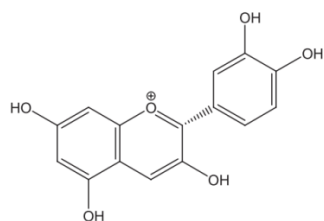


Figura 2: exemplo de antocianidina. Cianidina. Adaptado (15).

Relativamente aos compostos fenólicos mais frequentes no fruto de *Prunus avium L.*, são identificados com frequência ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, epicatequina, rutina, catequina, quercetina-3-O-rutinosídeo e ácido p-coumaroilquínico, destacando-se alguns na figura 3. Em relação às específicas antocianinas, as cerejas são ricas em cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-rutinosídeo e peonidina-3-glicosídeo (6,8,18,26,27). Outros compostos podem ser identificados, em quantidades vestigiais.

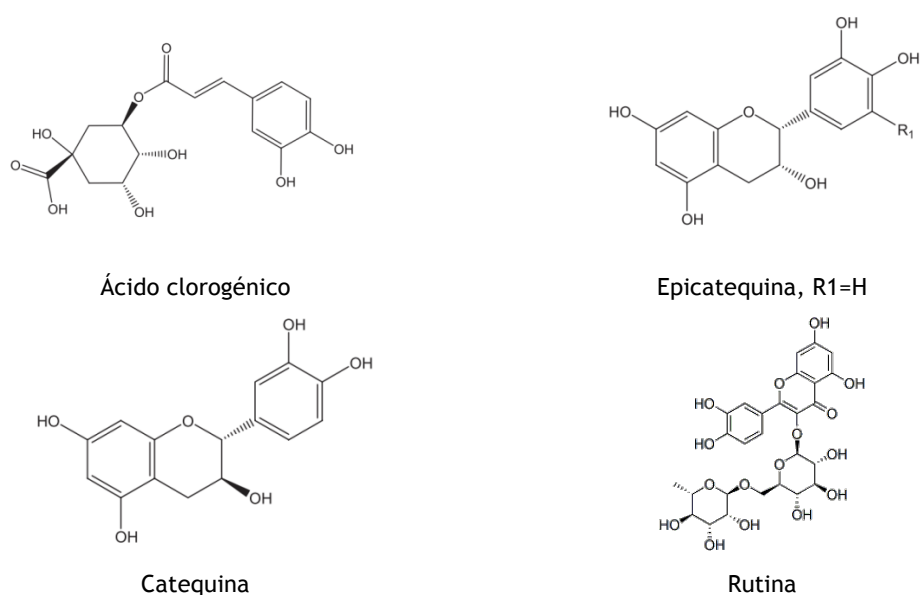


Figura 3: principais fenóis identificados nas cerejas. Adaptado (15,28).

## 2.2. Extração a Partir do Fruto de *Prunus avium L.*

Em qualquer estudo analítico a preparação da amostra é fundamental para o isolamento dos compostos de interesse permitindo assim resultados fidedignos, pelo que é necessário um conhecimento dos diversos métodos de extração para determinar o mais adequado à matriz alimentar em questão, neste caso, o fruto de *Prunus avium L.* (29). A imensa diversidade de compostos fenólicos existente, já referida, leva a que uma perspetiva reducionista não possa ser aplicada. As diversas metodologias de extração de compostos fenólicos em frutos têm de ter subjacente a literatura existente sobre os compostos passíveis de ser extraídos, a matriz alimentar e o âmbito do trabalho (30,31). A extração é um processo de separação, onde se

pretende que o analito(s) em causa seja isolado(s), minimizando as perdas deste(s). A eficiência da extração é influenciada pela natureza química dos compostos a extrair, o método, o tamanho das partículas, condições de armazenamento, substâncias interferentes e também por temperatura, agitação e tempo de extração. Por fim, destacamos o solvente escolhido como um dos principais fatores de sucesso dos diferentes processos de extração (14,32).

Tratando-se da análise de matrizes alimentares, a questão da conservação da própria fruta tem elevada relevância. Evidências mostram que alimentos preservados durante longos períodos de tempo, inclusive a temperaturas de congelação muito baixas podem levar a importantes perdas de compostos fenólicos e vitaminas (14,30,33). A conservação adequada, bem como o transporte, tem de ser garantida de forma a padronizar os resultados de forma convincente e diminuir as perdas de analito. De uma forma geral, a liofilização é considerada como a melhor forma de conservação duma matriz alimentar e dos seus analitos. Essencialmente consiste na remoção da água livre, diminuindo a possibilidade de desenvolvimento microbiano e reduzindo a oxidação dos compostos (15,34,35). A enorme presença de interferentes, dada a variedade estrutural e química de qualquer fruta, condicionam a realização de determinações e aumenta ainda mais a importância de uma adequada preparação prévia de amostra (30). Além da liofilização, a preparação da amostra pode incluir centrifugação, filtração, congelação entre outros (31).

A extração em si, corresponde, como referido, à separação dos componentes de interesse duma mistura, descartando potenciais contaminantes ou interferentes. De forma geral, o uso de solventes orgânicos é o método mais frequente para extração de compostos fenólicos em plantas. A escolha do solvente tem em consideração a seletividade, densidade, miscibilidade, recuperação, preço, pressão de vapor, viscosidade e estabilidade química e térmica. Solventes comuns são o metanol, etanol, acetona e acetato de etilo, podendo estes ser acidificados ou não. A extração sólido-líquido é considerada simples e eficiente no que diz respeito à recuperação de compostos fenólicos a partir de frutas (29,30,36). Uma das alterações mais relevantes a este processo é a utilização de ultrassons. A cavitação permite a disrupção das paredes celulares, facilitando a saída dos compostos de interesse e assim permitindo maiores recuperações de compostos fenólicos em menos tempo (29,36). Uma das desvantagens relativas à elevada eficiência de extração recorrendo a esta metodologia é a co-extração de açúcares, proteínas e ácidos orgânicos que têm o potencial de interferir nas determinações, seja por potencialmente modificar o resultado, seja por comprometerem o correto funcionamento dos sistemas de análise. Vários estudos referem, por esse motivo, a utilização de metodologias de extração em fase sólida (do inglês Solid Phase Extraction, SPE) como passo de purificação para separar a porção polifenólica dos restantes componentes (26).

A diversidade de técnicas de extração é elevada e estas são classificáveis pelas fases que se pretendem separar, pela metodologia empregue ou mesmo pelo sistema utilizado. No campo dos polifenóis, os mais frequentes são extrações líquido-líquido ou a SPE. A natureza fenólica torna os compostos relativamente hidrofílicos, sendo bem extraídos com solventes polares como a água, etanol, metanol ou misturas hidro-alcoólicas. Outras metodologias interessantes incluem a extração assistida por micro-ondas ou a extração de fluidos supercríticos, entre outros (29).

Posterior à extração pode ser incluído um passo de limpeza ou purificação antes de análise concreta a realizar (18). Tal permite eliminar alguns dos contaminantes referidos e concentrar os analitos pretendidos. Um exemplo é a já referida SPE. A aplicação destas técnicas permite obter resultados mais congruentes, fiáveis e replicáveis. A amostra fica depois pronta para a análise pretendida.

### 3. Biodisponibilidade

#### 3.1. Contextualização Fisiológica

Para que os compostos que são estudados como potencialmente benéficos, na promoção da saúde humana, possam exercer a sua atividade biológica, é imperativo garantir em primeiro lugar a sua passagem pelas barreiras biológicas de forma a atingirem a corrente sanguínea. Toda e qualquer determinação que venha a ser feita tem como base teórica o conceito de biodisponibilidade, que tem de ser intercalado com o menos conhecido conceito de bioacessibilidade, que embora de forma sobreponível apresenta díspares diferenças do anterior (37). Embora possam existir diferenças pequenas na definição, dependendo da perspetiva de abordagem, geralmente consideramos biodisponibilidade como a fração da quantidade de substância disponível para absorção, que entra para a circulação e não é metabolizada ou excretada antes de exercer o seu efeito pretendido (37). Este é um conceito farmacocinético bem estabelecido, cujas múltiplas formas de determinação serão discutidas adiante. Inclui a absorção, distribuição e bioatividade (38). Uma das principais preocupações da investigação farmacêutica, no desenvolvimento de novos fármacos, é conhecer, tão cedo quanto possível, uma previsão da biodisponibilidade que não raras vezes inviabiliza o fármaco em estudo (39,40).

A biodisponibilidade oral pode ser determinada recorrendo à equação 1. Nesta,  $F_a$  é a dose absorvida,  $E_h$  é o rácio de extração hepática,  $CL_h$  a *clearance* sanguínea hepática e  $Q$  é o fluxo sanguíneo hepático. Outras equações podem ser usadas.

$$F = F_a(1 - E_h) = F_a \left(1 - \frac{CL_h}{Q}\right) \quad (1)$$

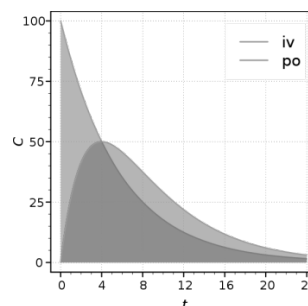


Figura 4: curva genérica para a biodisponibilidade de uma qualquer substância, por via oral e IV (CC0, domínio público).

A absorção de fármacos, e por extrapolação, de qualquer entidade química de interesse, é um processo complexo, que implica conhecer o funcionamento da mucosa intestinal e suas vicissitudes (41). Pela perspectiva farmacocinética podemos definir biodisponibilidade como a área sob a curva concentração plasmática/tempo, após a administração duma determinada dose de fármaco, como exemplificado pela figura 4. Esta área deverá ser comparada com aquela obtida aquando da administração duma idêntica dose de fármaco por via IV, onde se considera a absorção inexistente e o efeito máximo (38). Depende em larga escala das propriedades químicas da nova entidade em estudo, particularmente a estereoquímica, coeficiente de difusão, peso molecular, pKa, estabilidade, solubilidade e carga. (41,42).

Para o particular caso dos compostos fenólicos existe uma série de fatores fisiológicos que afetam a biodisponibilidade, além da já referida estrutura química e correspondentes propriedades físico-químicas, nomeadamente a matriz em que o composto é entregue, mas também o trânsito gastrointestinal, a flora gastrointestinal, interações com alimentos ou componentes digestivos, velocidade de esvaziamento gástrico, existência de patologias concomitantes, entre outros (16,39). O fluido produzido pela mucosa intestinal, muco, é uma mistura complexa viscosa, produzida pelas células caliciformes, que reveste e protege a mucosa, e possui uma função não apenas protetora, acabando por ser a primeira barreira ao contacto dos fármacos com a mucosa em si (43). A alimentação levada a cabo pelo sujeito de estudo pode também influenciar fortemente a absorção, particularmente no caso de dados fármacos, servindo de exemplo as conhecidas interações farmacocinéticas entre tetraciclina e o leite (44).

### 3.1.1. Mecanismos de Passagem das Moléculas pelo Epitélio Gastrointestinal

Conhecer os mecanismos subjacentes relativos à passagem das moléculas em estudo pelo epitélio propriamente dito permite clarificar alguma da complexidade inerente à absorção de fármacos (45). É possível distinguir 4 tipos de mecanismos de passagem, como elucidado na figura 5, nomeadamente a (1) difusão passiva pelas membranas, a mais frequente forma de passagem, limitada pelo tamanho das moléculas essencialmente; (2) transporte mediado, um mecanismo saturável que envolve proteínas intermembranares específicas, podendo ser ativo

ou passivo, conforme a utilização ou não de energia metabólica, que nem sempre resulta num aumento da absorção, mas também numa redução como é o caso da glicoproteína-P, uma bomba de efluxo; (3) endocitose, um mecanismo lento com gasto de energia que envolve a formação de vesículas contendo a substância a transportar e por fim o (4) transporte paracelular, para moléculas pequenas e sobretudo hidrofílicas, que passam pela junção entre as células. No entanto, apenas 0,1% da área do intestino permite este tipo de transporte (39,41,45,46).

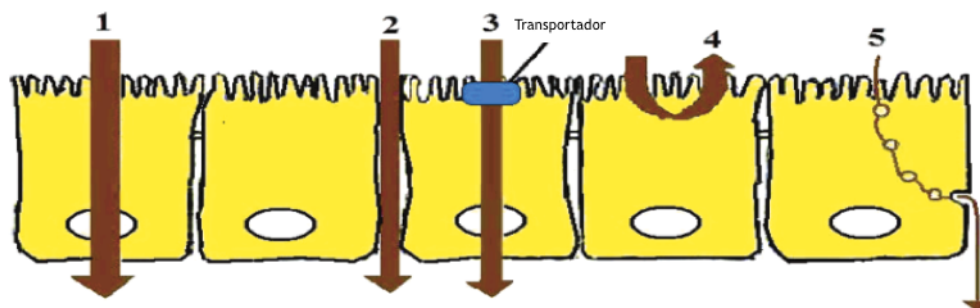


Figura 5: mecanismos de passagem celular. Adaptado (46)

### 3.2. Biodisponibilidade *versus* Bioacessibilidade

Embora frequentemente usados como sinónimos, os conceitos de biodisponibilidade e bioacessibilidade apresentam noções distintas, sendo importante efetuar esta distinção. Bioacessibilidade define-se como a quantidade de molécula em estudo que se liberta da matriz alimentar e fica, portanto, disponível para absorção, tendo em consideração a digestão, metabolismo e quaisquer transformações que a matriz sofra no processo (38). Naturalmente que este é um conceito pouco aplicável em farmacologia, pois parte-se do princípio que quando se estuda e ajusta a formulação medicamentosa, a absorção já estará garantida, existindo também uma série de determinações na área da Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica que permitem assegurar a correta libertação da molécula muito antes destes estudos. No entanto, no domínio da nutrição, este é um conceito particularmente importante (47,48).

No presente trabalho, parte-se duma matriz alimentar bem definida, a cereja, que sendo submetida a um processo de digestão *in vitro* sofre várias alterações quantificáveis, conseguindo-se determinar as variações durante os vários passos do processo digestivo, e com isto compreender a bioacessibilidade de compostos fenólicos presentes no fruto. É de referir que a bioacessibilidade é inversamente proporcional ao tamanho de partícula. É portanto previsível que alimentos em estado liquefeito, tenham maior bioacessibilidade (38). Este estudo é o primeiro passo na determinação da biodisponibilidade (48). A maioria dos estudos *in vitro*, necessários para prever a bioacessibilidade, baseiam-se em modelos digestivos simulados para efetivamente conhecer os elementos da matriz alimentar, particularmente com métodos estáticos de digestão *in vitro* (49-51). A compreensão do potencial em saúde

deste compostos tem de passar necessariamente por esta quantificação (52). No entanto, é necessário ressaltar que a exposição a um processo digestivo pode não ser benéfica para os compostos disponíveis. As condições extremas do sistema digestivo humano, que se tentam replicar tão veridicamente quando possível, podem comprometer a estabilidade de alguns dos compostos em estudo e diminuir a fração bioacessível (33,53).

### 3.3. Determinação da Bioacessibilidade e Biodisponibilidade

Para simplificar a explicação e por se considerar que ambos conceitos são indissociáveis, os métodos para abordar a determinação da biodisponibilidade e bioacessibilidade serão considerados conjuntamente (39). A determinação da biodisponibilidade, no âmbito de estudos que não remetam estritamente para a farmacologia, depende, em larga escala, como referido, da bioacessibilidade. Se um dado analito não é bioacessível, ou seja, se não se dissocia da matriz alimentar, então nunca será biodisponível e, portanto, não terá absorção. As metodologias impostas têm de ser pensadas no sentido de maximizar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos.

Vários fatores podem influenciar a bioacessibilidade, e naturalmente a matriz alimentar onde os compostos em estudo se encontram será um deles. Como referido, há uma relação inversamente proporcional entre o tamanho da partícula e a bioacessibilidade e, portanto, a biodisponibilidade. Partículas mais pequenas favorecem a libertação dos analitos e o contacto com a mucosa gástrica. A composição química dos alimentos, e também dos compostos a estudar influenciam o resultado. De forma geral a bioacessibilidade determina-se com métodos *in vitro*, tentando-se conhecer o comportamento dos alimentos e as diversas variáveis que podem alterar a fração bioacessível. A biodisponibilidade, por outro lado, pode ser fielmente determinada recorrendo a métodos *in vivo*, *ex vivo* ou *in vitro*. Para fármacos, metodologias *in silico* permitem um *screening* rápido.

#### 3.3.1. Metodologias *in vivo/ex vivo/in situ*

A biodisponibilidade é mais eficazmente determinada *in vivo*. Recorrendo a estudos de alimentação, em animais ou humanos, e com quantificações sistemáticas dos compostos no sangue ou urina, consegue-se conhecer a cinética de absorção e eliminação do analito. Estes estudos são naturalmente pouco exequíveis, particularmente em humanos, pela dificuldade em padronizar o consumo de um determinado analito e pela quase impossibilidade de controlar as variáveis existentes. Considerações éticas sobre a restrição alimentar necessária impõem-se também. Estes estudos cingem-se, portanto, a administrações de dose única, de forma a reduzir o desconforto experimentado pelos voluntários (26,54). Em ratos ou outros animais, estes estudos são mais práticos, sendo possível manter a dieta restrita por mais tempo e reduzir o número de variáveis em consideração e dessa forma obter resultados mais

fiáveis. Também técnicas envolvendo banhos de órgãos, como excisão de porções de intestino de rato ou a utilização de câmaras de Ussing, que requerem o sacrifício dum animal, não serão consideradas, apesar de serem técnicas *in vitro* (39).

### 3.3.2. Metodologias *in vitro*

No decurso dos últimos anos, com particular ênfase na farmacologia, surgiram uma série de técnicas laboratoriais *in vitro* que permitem uma correta estimativa das propriedades de absorção. A utilização de técnicas digestivas simuladas tem ganho uma particular importância em estudos de bioacessibilidade, que como referido são essenciais à quantificação da biodisponibilidade. Por outro lado, membranas artificiais permeáveis permitem obter uma noção da passagem de determinadas moléculas com base no princípio da difusão passiva por gradiente osmótico. A metodologia popularizada por Gil-Izquierdo *et al.* (49), envolvendo membranas dializáveis de celulose, numa modificação do trabalho de Miller *et al.* (55) é uma referência no campo da bioacessibilidade em nutrição. A matriz alimentar, após um processo digestivo simulado, é colocada em contacto com tubos de celulose que funcionam como filtro que permite a passagem de moléculas até aproximadamente 12 kDa. O conteúdo dos tubos é depois caracterizado, sendo a quantificação resultante extrapolada. Embora esta abordagem seja uma forma prática e que permite um rápido *screening*, foram os modelos celulares que se impuseram como ferramentas realistas de estudos de absorção de moléculas. Vários modelos celulares estão disponíveis para utilização em estudos de biodisponibilidade, nomeadamente as células MDCK, de epitélio renal dum *Cocker Spaniel*, que têm demonstrado aplicação nesta área (41,42,46). Também as linhas celulares HT29, células originárias dum adenocarcinoma do cólon; TC7, um subclone de células Caco-2, entre outras, têm interessantes aplicações em vários campos. No entanto, desde a sua descoberta em 1989, as células Caco-2 tornaram-se o indiscutível líder em *screening* rápido das propriedades de absorção, pelas características muito próprias que apresentam e em função da similaridade morfológica com os enterócitos humanos.

#### 3.3.2.1. As Células Caco-2

Quando em meados dos anos 80, Ismael Hidalgo focou o seu estudo na já existente linha celular Caco-2, estaria longe de imaginar a repercussão que o seu trabalho viria a ter na indústria farmacêutica. Esforços tinham vindo a ser feitos desde os anos 70 para determinar linhas celulares que viessem a permitir a cultura de células em monocamada de forma a replicar barreiras endoteliais (56). Estes resultaram infrutíferos, devido às dificuldades de cultura destas células e pela incapacidade de induzir diferenciação. O trabalho de Hidalgo surgiu assim como revolucionário e como uma das grandes bandeiras do laboratório de Borchardt na Universidade do Kansas (57). Esforços sérios no sentido de encontrar um modelo de permeabilidade celular *in vitro* foram feitos a partir de 1984, tendo Hidalgo começado

apenas em 1986, focando quase de imediato os seus esforços nas células Caco-2, já conhecidas pela propriedade de se diferenciarem em enterócitos (57). Em 1989 foi apresentado o resultado do seu trabalho: um método de cultura celular *in vitro* com a capacidade de produzir uma monocamada diferenciada de enterócitos, com confluência elevada, em aproximadamente 21 dias.

As células Caco-2 são, há mais de 20 anos, o padrão em *screening* de biodisponibilidade na indústria farmacêutica. É natural que sejam consideradas como uma abordagem algo reducionista de estudos de permeabilidade, em função dos modelos organotípicos, *in vivo*, *ex vivo* e outros já referidos, naturalmente mais complexos. São células que derivam dum adenocarcinoma de cólon humano, que não segregam mucina nem produzem um biofilme tampouco, sendo estes aspetos considerados limitações ao seu uso enquanto modelo. Apesar de derivarem duma única amostra, a sua utilização por todo o mundo e as diversas pressões a que foram sujeitas levam a que sejam consideradas uma população celular heterogénea, e podemos encontrar variações significativas nas características destas células (56). Esta problemática torna-se uma limitação no que diz respeito à validação e comparação dos resultados obtidos por parte de outros laboratórios.

É necessário enumerar, pelo menos, alguns dos aspetos que podem influenciar a cultura celular, para conhecer as limitações, vantagens e desvantagens deste tipo de modelo, com boas práticas de cultura celular em mente para obter resultados tão fiáveis e coerentes quanto possível. Na execução de qualquer trabalho científico, o rigor, precisão e reprodutibilidade são essenciais para tentar garantir que os resultados obtidos são consistentes com a realidade e asseguram, na medida do possível, a veracidade das conclusões passíveis de ser retiradas. Uma parte fundamental do sucesso neste campo vem da preparação prévia, do conhecimento inerente à aplicação do método escolhido, as suas vantagens, forças, desvantagens e pontos críticos (58-60).

Esta necessidade acentua-se quando o campo de estudo envolve a aplicação de métodos celulares. Sendo efetivamente entidades biológicas, as células requerem uma atenção particular na sua utilização e manuseamento, sob pena de não se chegarem a obter sequer resultados, ou pior, os resultados obtidos serem distorcidos e incoerentes. Nesse sentido, efetuou-se uma pesquisa sobre quais os cuidados requeridos por esta metodologia em particular, de forma a garantir a obtenção de resultados (59-61).

Essencialmente podemos agrupar os fatores que influenciam a cultura celular em dois grandes grupos: fatores relacionados com as células e fatores relacionados com o meio de cultura e com a superfície onde se pretende fazer o crescimento (56). Por outro lado, também a escolha do protocolo adequado, em função do material disponível, poderá fazer toda a diferença. Foram encontrados vários trabalhos sugerindo novos métodos inovadores de cultura

de células Caco-2, que demonstram ser possível a redução do tempo de cultura dos clássicos 21 dias para a obtenção de confluência para sete, ou até menos, dias. Tal redução é possível através da modificação dos meios de cultura e das condições a que as células são sujeitas (58,62,63). Ainda assim, apesar das eminentes vantagens, estes métodos não estão suficientemente consolidados para poderem ser utilizados na prática.

#### **a) Fatores Celulares**

A própria célula, como já referido, embora descenda duma única população, através das pressões seletivas exercidas por laboratórios do mundo inteiro, sofreu pequenas alterações, nomeadamente no que diz respeito à “idade” das mesmas (56). Também o conceito de “número de passagens”, definido como o grau de subcultura a que as células foram sujeitas, ou ainda o número de vezes que as células foram transferidas de veículo para veículo (64), pode influenciar o resultado a obter. A literatura é unânime, comprovando o nefasto efeito da “idade” nas células. As populações mais jovens apresentam diferenças como alterações na morfologia, resposta a estímulos, taxas de crescimento, expressão proteica e eficiência da transfecção [introdução propositada de ácidos nucleicos nas células] mais elevadas (64).

Relativamente à atividade enzimática, também esta varia com o número de passagens. Por exemplo a expressão de sucrase-isomaltase aumenta com o número de passagens, e a fosfatase-alcálica diminui. A passagem de vários substratos verifica-se diminuída nas células com maior número de passagens, no entanto, o transporte da hormona libertadora de tirotrópina apenas se verificou nessas mesmas células, ou seja, nas células de maior “idade”. O número de passagens está ainda associado a diferenças metabólicas, nomeadamente a nível da CYP3A4, cujo efeito pode ser um fator disruptor num estudo de bioacessibilidade, em que os compostos estudados são facilmente modificados pelas enzimas metabólicas, um efeito aliás estudado em múltiplos trabalhos (6,42,52,65,66).

#### **b) Fatores Relativos à Cultura Celular**

O meio de cultura, as condições ambientais e reagentes utilizados têm um peso preponderante no sucesso da aplicação do método e obtenção de resultados. Como já referido, também as próprias células apresentam um conjunto de fatores de variação que potencialmente podem produzir alterações substanciais na obtenção dos resultados, e sobretudo na reprodutibilidade dos mesmos, pois, pelos fatores já estudados, as divergências evolutivas nas populações de células Caco-2 constituem obstáculos à correta reprodução e obtenção de resultados por diferentes laboratórios. Tal representa uma crítica frequente à utilização de células Caco-2, e têm sido publicados múltiplos trabalhos procurando uma uniformização das técnicas e procedimentos a aplicar em estudos envolvendo culturas celulares (39,46)

Relativo ao meio de cultura, também o pH do meio é um pertinente fator de modulação dos resultados, frequentemente esquecido. Um estudo em particular (67), conclui que as condições experimentais devem refletir rigorosamente as condições *in vivo* e, através de determinações experimentais, verificou que um pH do compartimento apical de 6,0 (em vez de 7,0) mostrou uma correlação mais realista com a absorção *in vivo* (neste estudo o compartimento basolateral foi mantido a pH 7,0 - pH fisiológico).

A justificação para o fenômeno citado no parágrafo anterior estará relacionada com um eventual microambiente ligeiramente mais ácido presente nas vilosidades e microvilosidades intestinais, determinado em 5,8-6,3 - mais baixo que o “grosso” da solução do intestino delgado (56,67). Embora as células Caco-2 contenham microvilosidades, dado que se diferenciam em enterócitos, tal microambiente não se proporciona, devido à inexistência da camada de mucina no lado apical das células Caco-2. Naturalmente o pH do lado basolateral será efetivamente de 7,4 - o pH fisiológico.

Ainda sobre os fatores que podem influir nos resultados, podemos destacar a densidade de cultura celular (número de células por unidade de área), que deve ser elevado para garantir a confluência simultânea, o tempo de cultura, e a expressão diferenciada de transportadores de nutrientes, matriz extracelular e moléculas de adesão (46,56,61,64,68).

## **4. Digestão *In Vitro***

### **4.1. Interesse e Contextualização**

A utilização dum método digestivo *in vitro* é, como referido, fundamental em estudos de biodisponibilidade e bioacessibilidade em nutrição. Embora em farmacologia propriamente dita o conceito não seja idêntico, pelos motivos anteriormente referidos, caracterizar o potencial disponível para absorção, a partir da matriz alimentar em estudo, permite determinar objetivamente a percentagem de compostos bioativos disponíveis para absorção e daí estimar a biodisponibilidade através de estudos de permeabilidade (39,69,70).

A digestão é um processo fisiologicamente agressivo. Qualquer alimento consumido pelo ser humano será sujeito a um tratamento mecânico, químico e enzimático que consegue reduzir o mesmo a meras partículas. Em farmacologia são frequentes os exemplos de fármacos que, pela sua constituição química, não resistem à digestão, sendo remetidos para outras formas de administração exclusivamente por isso. Por este motivo, a aplicação dum modelo digestivo *in vitro* vai permitir quantificar o que acontece aos compostos fenólicos selecionados durante a mesma e assim perceber que parte destes estará efetivamente disponível para absorção. A quantificação após cada fase digestiva, oral, gástrica e intestinal, permitirá também conhecer qual a fase mais perigosa para os compostos fenólicos. Apenas após este processo será possível determinar a fase bioacessível. Uma incorreta determinação desta fase terá

como consequência uma subestimação da real fração biodisponível. A dificuldade em padronizar um método digestivo simulado prende-se com a elevada variedade de fatores de divergência e de variáveis que afetam tanto o método como o objeto em estudo. O pH, secreções, velocidade de esvaziamento gástrico, trânsito intestinal e flora intestinal são parâmetros que variam consideravelmente de forma interindividual. Além destes, a matriz alimentar, com a sua microestrutura, riqueza relativa em macro e micronutrientes e seus constituintes aumentam o número de variações possíveis (43,49,65,71).

A digestão começa na cavidade oral. Aqui o alimento ingerido é submetido a forte tensão mecânica, sendo reduzido a partículas consideravelmente mais pequenas. Os dentes permitem rasgar e esmagar os alimentos, aumentando a eficiência deste processo. Alimentos em pedaços mais pequenos tornam a digestão mais completa, pelo aumento da área exposta aos elementos digestivos. A saliva, o fluido presente, tem um pH ligeiramente ácido e possui enzimas como a alfa-amilase ou a lipase lingual que assistem na degradação de hidratos de carbono complexos e lípidos. Embora este passo dure apenas uma média de alguns segundos é de extrema importância (51,70,72,73).

De seguida, o bolo alimentar é transportado pelo esófago e chega ao estômago, onde se dá a digestão gástrica. Embora a tensão mecânica não seja tão intensa como na boca, os movimentos peristálticos são eficientes na mistura do alimento com o suco gástrico. O pH extremamente ácido, devido ao ácido clorídrico produzido na mucosa, tem uma dupla função: a esterilização do bolo alimentar e a ruptura de membranas e macronutrientes, auxiliando na redução do tamanho de partícula. O suco gástrico compreende ainda várias enzimas, como a pepsina e lipase gástrica. Esta fase é caracterizada por digestão mecânica e enzimática e dura de 15 minutos a 3 horas, dependendo do alimento ingerido (17,52,66,73,74).

O esvaziamento gástrico é função primariamente do tipo de alimento e do grau de digestão e dá-se quando o quimo ácido tem uma consistência adequada. O primeiro segmento do intestino delgado recebe secreções pancreáticas e biliares, sendo secretado bicarbonato de sódio que neutraliza a acidez do quimo e permite a atuação das enzimas presentes no intestino, nomeadamente as amilases, pancreases e lipases que emulsificam os lípidos e continuam a degradação das restantes macromoléculas (37,39,41,75).

Embora a maioria do processo digestivo e absorptivo seja concluída no intestino delgado, no cólon ocorrem alterações importantes, devido à fermentação microbiana e absorção de água. É nesta porção onde os restos alimentares não digeridos, nomeadamente alguns hidratos de carbono e proteínas, são fermentados pela flora intestinal. Ocorre também reabsorção de eletrólitos e sais biliares (51,75,76).

Os métodos digestivos *in vitro*, por norma, não simulam a digestão a nível do cólon, não menosprezando a importância deste passo no processo digestivo como um todo, mas devido à dificuldade de padronizar os efeitos da fermentação microbiana, embora estudos tenham sido feitos nesse sentido (61).

#### 4.2. Seleção do Método para Processo Digestivo *in vitro*

Através de uma pesquisa na literatura é possível verificar que, embora existam bastantes trabalhos particularmente nesta área, não existe um método digestivo *in vitro* padronizado, embora esforços já tenham sido feitos nesse sentido (51). Isto deve-se à miríade de diversos fatores referidos anteriormente e à variada índole de necessidades distintas. Assim, trabalhos no âmbito de nutrição, de farmacologia ou toxicologia têm abordagens que podem ser completamente distintas. Conseguimos, porém, distinguir modelos estáticos monocompartimentais, multicompartimentais e dinâmicos.

Os modelos estáticos monocompartimentais são os mais frequentes. Os diversos passos dão-se no mesmo biorreactor, sendo as enzimas e os diversos componentes adicionados de forma sequencial e consecutiva. Os modelos estáticos não reproduzem os movimentos dinâmicos ou a contínua secreção que se dá no ambiente fisiológico. Modelos monocompartimentais dinâmicos, por outro lado, já têm em conta a especificidade das várias regiões onde ocorre a digestão, não tendo em conta os importantes movimentos peristálticos. Atualmente já existem sistemas integrados que simulam as condições do estômago e de porções do intestino delgado, baseados em dados *in vivo*. Assim, é possível reproduzir a temperatura, alterações de pH, esvaziamento gástrico e adição de secreções que reproduzem mais fielmente as fisiológicas (47,72,73).

A escolha do método tem de ter em conta os diversos fatores já referidos, tanto relativamente ao método em si como à matriz alimentar. Estes sistemas *in vitro* têm sido extensivamente utilizados em estudos de nutrição, avaliação de segurança de componentes alimentares, estudos farmacológicos, entre outros. Embora com limitações, nomeadamente incapacidade de reproduzir as secreções gástricas, resposta neural e hormonal, ausência de flora microbiana ou dificuldade em replicar os complexos movimentos peristálticos, métodos digestivos *in vitro* assumem um papel importante na investigação, fornecendo perspectivas valiosas (38,65,71).

## 5. Metodologias de Análise e Quantificação de Componentes Bioativos

### 5.1. Princípios de Cromatografia

As técnicas cromatográficas, com os seus primórdios ainda na primeira metade do século XX, são hoje um conjunto extremamente variado de metodologias que conseguem atingir, com maior ou menor grau de pureza e precisão, uma separação total dos componentes duma dada mistura. Assim, conseguimos definir cromatografia como um processo que separa os múltiplos componentes do analito partindo de duas fases: a fase móvel e a fase estacionária (77). O princípio fundamental reside no grau variável dos componentes aderirem à fase estacionária e serem posteriormente eluídos pela fase móvel.

Os diversos métodos cromatográficos podem ter utilidade em diferentes tipos de utilização, sendo fundamentais no âmbito da toxicologia, química analítica, ciência forense, fitoquímica, farmacologia e tantas outras áreas do conhecimento. Uma descrição aprofundada dos diversos tipos fica fora do escopo deste segmento. A classificação do tipo de cromatografia é baseada nos diferentes estados físicos da fase móvel e da fase estacionária (30,78).

Conseguimos distinguir vários tipos de cromatografia, partindo da diferenciação do estado físico da fase móvel e da fase estacionária. Outras distinções podem ser aplicadas. As amostras podem encontrar-se num estado líquido, gasoso ou sólido e podem ser constituídas por uma solução dum simples componente ou uma mistura altamente complexa em matrizes elaboradas. Foi para separar pigmentos presentes em plantas que o botânico russo Tswett usou uma forma simples de cromatografia líquido-sólido. Nesta altura, a identificação da separação era visual, pela observação dos pigmentos. O termo cromatografia derivada do grego *chromo-*, um prefixo que designa cor embora, atualmente, a cor pouco tenha a ver com a maioria das técnicas cromatográficas (79).

Posteriormente, outros investigadores perceberam que a separação líquido-líquido também seria possível, colocando a fase móvel, água por exemplo, numa base de sílica. De seguida, verificou-se que substituir a fase móvel líquida por um gás aumentaria a velocidade da separação, com proporcional aumento da eficiência. Surge assim a cromatografia gasosa. No entanto, o seu valor apenas viria a ser compreendido anos mais tarde e apenas em meados dos anos 60 do século passado, tendo sido nesta altura lançados os fundamentos da cromatografia líquida de alta eficiência, no seu original HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*. Atualmente, é possível separar gases e substâncias voláteis por cromatografia gasosa, matérias de elevado peso molecular por cromatografia líquida e mesmo separações simples por cromatografia em camada fina, com um custo baixo (79,80).

A cromatografia líquida de ultra *performance* surge como uma melhoria aos equipamentos de HPLC, partilhando os mesmos princípios, mas exibindo resolução adicional. Esta resolução adicional é possível de alcançar já que este tipo de sistemas suporta pressões mais elevadas, permitindo ao operador diminuir as dimensões da fase estacionária. Conhecer a forma de funcionamento e os princípios teóricos adjacentes a esta técnica é fundamental para a interpretação dos resultados. A principal diferença de outras técnicas de elevada eficiência, como a cromatografia gasosa (GC) é o facto da última depender da possibilidade das substâncias serem volatilizadas. Estima-se, a título de exemplo, que apenas 20% dos compostos orgânicos conhecidos possam ser analisados através de GC, sendo uma óbvia limitação (80).

Assim, e de forma geral, o sistema de distribuição encontra-se na forma de uma coluna, que pode ter um comprimento de poucos centímetros a vários metros, revestida com partículas que constituem a fase estacionária. A fase móvel, um líquido ou gás, é forçado sob pressão (ou não), pela coluna para eluir a amostras. Num primeiro momento, como resultado das diferentes forças moleculares, os solutos são retidos pela fase estacionária, sendo que os que possuem menos afinidade para esta serão eluídos primeiro. Desta forma, e assumindo que a eluição é lenta o suficiente, produz-se a separação dos solutos. Na tabela 2, abaixo, encontra-se uma possível classificação das técnicas cromatográficas (77,79).

Tabela 2: classificação de técnicas cromatográficas. Adaptado (79)

Fase Móvel	Fase Estacionária
Gás Cromatografia Gasosa (GC)	Líquida Cromatografia Gás-Líquido
	Sólida Cromatografia Gás-Sólido
	Líquido Cromatografia Líquido-Líquido
Líquida Cromatografia Líquida (LC)	Sólido Cromatografia Líquido-Sólido

Em cromatografia líquida podemos ainda distinguir entre cromatografia de fase normal e fase reversa. A primeira refere-se ao caso em que a fase estacionária é mais polar que a fase móvel e a segunda denomina o caso em que a fase estacionária apresenta menor polaridade que o solvente utilizado na fase móvel (79).

O grau de separação é ditado pelo coeficiente de distribuição da substância, sendo este definido como a razão entre as concentrações dum composto numa mistura de duas fases, em equilíbrio, permitindo quantificar a diferença de solubilidade. O coeficiente de distribuição de uma dada substância é função de vários aspetos, cujo efeito sinérgico resulta num valor

numérico. As mais importantes são forças moleculares, nomeadamente forças de dispersão, iónicas, polares e interações hidrofílicas ou hidrofóbicas (29,45,81).

## 5.2. HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Tendo em conta o sistema analítico utilizado no presente documento, irá realizar-se de forma resumida uma breve introdução sobre o mesmo.

Em cromatografia líquida, a amostra tem de ser dissolvida num solvente orgânico, e a maioria dos solventes não levanta problemas de foro técnico. A escolha do solvente prende-se com a afinidade deste para com os constituintes da amostra a separar. Se a afinidade for demasiado elevada, é possível que os elementos da mistura sejam eluídos rapidamente, não se obtendo a separação em picos necessária. Em cromatografia líquida é fundamental manter o número de pratos teóricos elevado, isto é, elevada eficiência na forma de capacidade de eluição com baixa dispersão dos picos produzidos pelo analito. Quanto maior o número de pratos teóricos, maior o grau de separação da mistura. Uma série de fatores pode levar a uma diminuição deste valor, ou seja, à obtenção de picos largos e possivelmente sobrepostos, nomeadamente o *multipath effect*, que se refere aos “percursos” que o analito pode fazer entre as partículas de fase estacionária. Tal prevê que alguns destes reflitam uma maior distância percorrida até à saída da coluna, demorando por isso mais tempo. O fluxo de fase móvel pela coluna pode também ocorrer a diferentes velocidades nesta, ou a difusão molecular, afetada por fatores como a velocidade geral de fluxo. Outros aspetos podem contribuir para este fenómeno (36,77,80,82).

A coluna (fase estacionária) é dos componentes mais importantes num sistema cromatográfico. Assume diversas formas, conforme o tipo de cromatografia e o seu comprimento pode ir desde poucos centímetros até vários metros. Um cromatograma, o registo efetuado à saída do detetor, é função primariamente da coluna, da fase móvel e da intensidade do sinal gerado. Relativamente à coluna, dois aspetos são fundamentais: o seu comprimento e o tamanho da partícula que constitui a fase estacionária. Um comprimento maior permite obter uma maior separação dos picos, pois aumenta o tempo de eluição. Por outro lado, um menor tamanho de partícula aumenta a área de superfície da fase estacionária, aumentando por isso a adsorção. Isto permite maior precisão e eficiência de separação (78-80,82).

Garantir a resolução do cromatograma obtido é fundamental para a correta identificação e quantificação dos analitos. O fator de retenção, a razão entre o tempo durante o qual um analito é retido na fase estacionária e o tempo em que é retido na fase móvel, deverá oscilar entre 1 e 10, ajustando-se a fase móvel em função do valor obtido. A qualidade da coluna e dos reagentes é fundamental para obter picos devidamente separados, existindo estratégias a

adotar para atingir este propósito. Uma otimização da velocidade de fluxo é também importante. Uma outra alternativa para aumentar a resolução pode passar por um aumento do fator de separação, podendo considerar-se uma diferente fase móvel, em primeiro lugar, seguido de uma mudança na fase estacionária, trocando de coluna (78,80).

Num sistema cromatográfico de HPLC conseguimos distinguir vários elementos, cujo conhecimento e compreensão de funcionamento são fundamentais para a sua operação. A bomba é o equipamento controlável por computador capaz de manter o sistema sob muito elevada pressão e manter o fluxo de solvente constante. O forno da fase estacionária corresponde ao segmento onde são mantidas as colunas, sendo possível configurar a temperatura a que se pretende que sejam realizadas as medições. O importante efeito da temperatura será abordado posteriormente. O *sampler* e injetor são os componentes responsáveis por manter e injetar as amostras. Na maioria dos equipamentos modernos é possível manter um elevado número de amostras, podendo-se configurar a temperatura a que são mantidas. Por fim, o detetor, que pode apresentar várias configurações, em virtude do que se pretende determinar. Exemplos de detetores são o detetor de ultravioleta (UV), o detetor de *diode array* (DAD), o detetor de fluorescência (FLD), o detetor de electroquímica (ECD) ou o detetor de espectrometria de massa (MS) A coluna, um dos mais importantes componentes, foi já discutida anteriormente. (15,77).

Um outro aspeto crucial para o funcionamento dos sistemas de HPLC é o efeito da temperatura. De forma geral (mas não exclusiva), um aumento da temperatura permite melhor eficiência, já que a diminuição da viscosidade do solvente facilita as transferências de massa. Isto permite um menor tempo de análise, pelo que também a temperatura deve ser sujeita a otimização. No entanto, temperaturas mais elevadas podem levar a uma degradação dos compostos em estudo ou até do próprio solvente, prejudicando a quantificação. Temperaturas mais elevadas podem levar ao aparecimento de bolhas, devido à evaporação do solvente, prejudiciais para a coluna, comprometendo também a uniformidade dos resultados obtidos (78,80).

Durante a validação e preparação do método cromatográfico, esforços devem ser feitos no sentido de analisar os cromatogramas obtidos e otimizar o método recorrendo às ferramentas e bibliografia existentes, tendo em consideração aspetos variados como a coluna, fase móvel, velocidade de fluxo, temperatura de funcionamento, compostos a analisar, entre outros.



## II. Parte Experimental

### 1. Preparação das amostras de cereja

Neste trabalho foram utilizadas 6 variedades de cereja da região do Fundão, *Saco* (colheita de 2015 e 2017), *Summit*, *Sweetheart*, *Primulat*, *Brooks* e *Earlise*, colheita de 2015, as quais foram gentilmente cedidas pela “Cerfundão - Embalamento e comercialização de cerejas da Cova da Beira, Lda.”. As cerejas colhidas em 2015 foram conservadas a -20 °C durante 1 mês até posterior processamento e as que foram colhidas em 2017 foram processadas de imediato.

Foram pesados cerca de 200 g para cada amostra de cereja, fresca ou após descongelamento. Após a pesagem, a fruta foi congelada a -80° C, durante pelo menos 24 horas, garantindo que todas as moléculas de água livre se encontravam no estado sólido, permitindo que a água livre passe diretamente para o estado gasoso, antes de se proceder à liofilização (Savant, Novalyphe-NL500, EUA), durante 60 horas. Este processo foi concluído após verificação da perda quase total da água do fruto. O rendimento de liofilização é apresentado pela razão entre a massa final e inicial, de acordo com a seguinte equação, equação 2.

$$\eta = \frac{m_{\text{liofilizada}}}{m_{\text{fresca}}} \times 100 \quad (2)$$

### 2. Extração a partir do fruto liofilizado

Partindo do fruto de *Prunus avium* L liofilizado foi realizado um processo de extração direcionado para os compostos fenólicos. Neste, foi utilizado metanol acidificado com 0,1% de HCl, usando uma proporção de 1 g de fruto liofilizado para 20 mL de solvente. A amostra foi colocada num banho termostaticado (P-Selecta Unitronic-OR, Espanha) durante 2 horas a uma temperatura de 35° C e agitação de 64 rpm. Este processo de extração foi repetido duas vezes. Posteriormente procedeu-se a centrifugação do extrato durante 20 min a 4000 rpm (Beckman Coulter, Allegra X22R, EUA). A presença de pequenas quantidades de HCl permite aumentar o rendimento da extração das antocianinas e antocianidinas, sem comprometer os demais ácidos fenólicos.

O solvente foi posteriormente evaporado (Rotavapor R-215, Buchi Switzerland), a pressão reduzida (130 mbar) e temperatura de 35 °C, estável, até obtenção de extrato seco, que se apresenta como um produto viscoso, similar a caramelo, de cheiro doce e frutado. Em função da probabilidade de degradação de antocianinas e antocianidinas, a temperatura do procedimento não deverá ultrapassar os 35 °C. O extrato obtido foi conservado em frio, a 4° C, e protegido da luz até à sua utilização.

Este procedimento foi realizado para as seguintes variedades de cereja, oriundas da região do Fundão: *Saco* (colheita de 2015 e 2017), *Summit*, *Sweetheart*, *Primulat*, *Brooks* e *Earlise*. A

eficácia da extração foi quantificada mediante o cálculo do rendimento da mesma, de acordo com a equação 3.

$$\eta = \frac{m_{extrato}}{m_{fruta\ liofilizada}} \times 100 \% \quad (3)$$

### 3. Desenvolvimento e Validação do Método por HPLC-DAD Para a Quantificação de Compostos Fenólicos

Com o intuito de se demonstrar que o método analítico desenvolvido é adequado ao propósito desejado, é necessário submeter o mesmo a um processo de validação. Assim, a metodologia selecionada foi validada através de um protocolo definido internacionalmente com a duração de 3 dias segundo os critérios de validação da *Bioanalytical Method Validation*. Os parâmetros estudados foram a seletividade, linearidade e modelo de calibração, precisão e exatidão, limites de detecção e quantificação (83). Inicialmente serão descritos os reagentes e soluções utilizados, sistema cromatográfico, condições cromatográficas e finalmente o processo de validação.

#### 3.1. Reagentes e Condições

##### 3.1.1. Reagentes e Padrões Analíticos

Os padrões analíticos cianidina, quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo foram adquiridos à Extrasynthesis, França. Os restantes padrões, nomeadamente, quercetina, ácido gálico, ácido p-coumárico, rutina, epicatequina e ácido clorogénico, foram obtidos da Sigma-Aldrich, Portugal.

Para a preparação das fases móveis e restantes soluções foi utilizado acetonitrilo (Carlo Erba, Itália), e metanol (Fisher Scientific, Reino Unido). Todos os reagentes utilizados tiveram grau de pureza HPLC. O ácido trifluoroacético (grau pró-análise) foi adquirido à Sigma-Aldrich, Portugal.

##### 3.1.2. Soluções Padrão e Outras Soluções

Foram preparadas de forma individual nove soluções padrão para os compostos cianidina, cianidina-3-glicosídeo, quercetina, ácido gálico, ácido p-coumárico, rutina, epicatequina, quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e ácido clorogénico em metanol, numa concentração de 1 mg/mL. Estas soluções padrão foram mantidas em recipiente fechado em ausência de luz e a 4° C até à sua utilização. No caso das soluções de cianidina, quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo estas foram mantidas nas mesmas condições, mas a uma temperatura de -20°C de forma a minimizar a degradação destes compostos.

Relativamente à fase móvel, esta consistiu numa mistura de acetonitrilo (linha A) e 0,1% de ácido trifluoroacético em água (Linha B). No caso da solução de ácido trifluoroacético 0,1%, para um balão de volumétrico foi pipetado um volume de 1 mL de ácido trifluoroacético e adicionado água milli-Q até perfazer 1000 mL. Após a preparação das soluções referidas as mesmas foram desgaseificadas em banho ultrassónico durante 15 minutos.

### 3.1.3. Sistema cromatográfico

Para a realização do processo de validação e posterior análise de amostras foi utilizado um sistema de HPLC, modelo 1290 da Agilent (Santa Clara, CA, EUA), estando equipado com um detetor de fotodiodos modelo 1260 da mesma marca. Os compostos foram separados recorrendo a uma coluna Eclipse Plus C18 (3,5 $\mu$ m, 4,6x100mm) da Agilent Technologies (Soquímica, Portugal)

### 3.1.4. Condições cromatográficas

Como referido anteriormente, a composição da fase móvel utilizada foi acetonitrilo (linha A) e ácido trifluoroacético 0,1% (linha B) e trabalhou-se a um fluxo de 0,5 mL/minuto. O tempo total do procedimento cromatográfico foi de 45 minutos, e foram utilizadas as seguintes condições:

- Condições iniciais: 10% de A, mantidas até aos 3 minutos.
- Do minuto 3 ao minuto 15 utilizou-se 15% de fase móvel (linha A).
- Do minuto 15 ao minuto 20 as condições foram mantidas constantes com uma proporção de 15% de fase móvel da linha A.
- Do minuto 20 ao minuto 25 a proporção de fase móvel da linha A aumentou para 18%.
- Do minuto 25 ao minuto 40 utilizou-se 30% de fase móvel de linha A.
- Finalmente, foi necessário um período de 5 minutos foi necessário para reequilibrar a coluna, tempo após o qual regressou-se às condições iniciais.

O volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu$ L, a temperatura do amostrador foi mantida a 4°C e a da coluna foi de 35°C. Os comprimentos de onda utilizados foram 280 nm, 320 nm, 360 nm e 520 nm (comprimentos de onda máximo para cada um dos compostos em estudo).

## 3.2. Validação do Procedimento Analítico

Como indicado anteriormente, antes de proceder à quantificação dos compostos fenólicos nas amostras de cerejas, o método descrito foi validado segundo critérios internacionais. Os parâmetros estudados foram: seletividades, linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão.

### 3.2.1. Seletividade

A seletividade define-se como a capacidade de um método analítico diferenciar e quantificar o analito desejado na presença de outros componentes da amostra. Por esse motivo um conhecimento intrínseco da amostra é fundamental de forma a poder distinguir potenciais interferentes do método a validar. Como se pretende a análise de mais de um analito, deve-se garantir que os mesmos não interferem mutuamente.

Assim sendo, foram injetados os padrões puros, referidos anteriormente, para determinação do tempo de retenção e comprimento de onda ao qual a absorção é máxima. Os picos obtidos para cada um dos compostos encontram-se no anexo análogo, figuras 6 a 18 correspondendo à concentração de 100 µg/mL.

### 3.2.2. Curva de Calibração

Define-se como a relação entre a resposta do analito após identificação perante uma concentração definida do mesmo. Para este estudo, conforme o protocolo, utilizado é necessário um mínimo de seis calibradores para além de uma amostra branco. Para além do estudo da linearidade, foi estudado o limite de quantificação (LLOQ). Este parâmetro (do inglês - *Lower Limit of Quantification*) corresponde à concentração mais baixa na curva de calibração, sendo necessário que o pico correspondente seja identificável, discreto, e reprodutível com uma precisão de 20% e exatidão entre 80-120%.

Para a construção da curva de calibração foram usados 6 calibradores distribuídos dentro do intervalo 2 - 50 µg/mL. Para além do estudo destas concentrações, conforme o guia de validação utilizado, foram preparados e analisados 3 *quality controls*, em triplicado, para as concentrações 4, 15 e 40 µg/mL. A partir da regressão linear das áreas obtidas, chegou-se às curvas de calibração que se podem encontrar na tabela 3.

Tabela 3: dados relativos á linearidade dos analitos em estudo.

Analitos	Intervalo de linearidade	Curva Calibração		r <sup>2</sup>	LLOQ (µg/mL)
		m	b		
Ácido gálico	2 - 50 µg/mL	102,30 ± 5,27	-18,21 ± 75,86	0,998±0,0017	2 µg/mL
Ácido p-coumárico		258,27 ± 2,23	-270,85 ± 87,54	0,996±0,0028	
Rutina		22,78 ± 1,50	-14,97 ± 31,13	0,998±0,0031	
Ácido clorogénico		74,93 ± 3,29	-83,55 ± 18,42	0,995±0,0046	

<b>Epicatequina</b>	26,99 ± 6,10	-14,87 ± 16,87	0,998±0,0003
<b>Cianidina</b>	69,01 ± 0,95	5,69 ± 11,13	0,998±0,0019
<b>Quercetina-3- 4'-di-O- glicosídeo</b>	9,43 ± 2,75	-7,73 ± 5,78	0,999±0,0014
<b>Cianidina-3- O-glicosídeo</b>	46,31 ± 1,28	-55,74 ± 36,41	0,999±0,0013
<b>Quercetina</b>	44,32 ± 1,11	-81,25 ± 37,42	0,998±0,0017

### 3.2.3. Exatidão e Precisão

A exatidão permite conhecer a proximidade da média dos resultados obtidos com a concentração real do analito presente. É determinada replicando as quantificações de amostras que contenham concentrações definidas do analito. O erro médio relativo (ERM) deverá estar dentro de 15% do valor real, exceto no LLOQ, onde poderá estar até 20% do valor real. O desvio da média do valor real da concentração serve como medida de exatidão.

A precisão, por outro lado, define a proximidade das medições individuais quando realizadas repetidamente a alíquotas múltiplas dum mesmo volume de matriz. No decorrer da validação foram estudadas a precisão intradia e a precisão interdia. A precisão intradia, ou repetibilidade, representa o grau de concordância entre resultados de medições sucessivas de várias amostras efetuadas sob as mesmas condições (Ex: operador, dia, equipamento e laboratório). Já a avaliação da precisão interdia, ou reprodutibilidade, envolve a variação de certas condições previamente definidas, tais como: diferentes dias, analistas ou equipamentos. A precisão é expressa habitualmente em termos de coeficiente de variação (CV; %). A precisão determinada não deve exceder 15% do erro médio relativo, exceto no LLOQ onde não deve exceder os 20%.

Assim, para a análise da precisão intradia e exatidão, foram fortificadas amostras com todos os analitos de estudo às concentrações de 2, 15 e 40 µg/mL. Para cada uma das concentrações foram efetuadas seis réplicas, procedendo-se em seguida à extração e avaliação da concordância entre as medições efetuadas no mesmo dia. Os resultados encontram-se expressos na tabela 4.

Para a análise da precisão interdia e exatidão (n=3), foram preparadas e analisadas amostras fortificadas com os analitos de estudo às concentrações de 2; 5; 10; 20; 30 e 50 µg/mL. Os resultados encontram-se expressos na tabela 4.

O conjunto de dados obtido permite garantir que as quantificações realizadas com o método, dentro do intervalo estipulado são precisas e exatas, sendo um dos fundamentos do processo de validação.

Tabela 4: resultados da quantificação a partir de calibradores padrão, média dos triplicados.

Composto		Concentração (µg/mL)	Concentração calculada (µg/mL)	Desvio Padrão	CV (%)	ERM (%)
Ácido gálico	Precisão Interdia	2	1,60	0,06	3,75	-20,15
		5	5,12	0,1	1,95	2,37
		10	10,29	0,17	1,65	2,86
		20	20,37	0,45	2,21	1,86
		30	29,42	1,45	4,93	-1,94
	Precisão Intradia	50	50,06	0,53	1,06	0,13
		2	1,61	0,09	5,59	-19,57
		15	16,37	0,78	4,76	9,11
		40	37,78	1,82	4,82	-5,54
		Ácido p-coumárico	Precisão Interdia	2	2,29	0,05
5	5,48			0,26	4,74	9,59
10	10,07			0,16	1,59	0,74
20	19,86			0,05	0,25	-0,68
30	27,65			0,19	0,69	-7,83
Precisão Intradia	50		50,91	0,62	1,22	1,82
	2		1,46	0,32	18,18	-26,98
	15		16,04	0,36	2,24	6,95
	40		42,91	1,02	2,38	7,28
	Rutina		Precisão Interdia	2	1,56	0,06
5		5,36		0,2	3,73	7,30
10		10,15		0,04	0,39	1,46
20		20,25		0,07	0,35	1,24
30		30,04		0,08	0,27	0,12
Precisão Intradia		50	50,34	0,57	1,13	0,68
		2	1,82	0,12	6,59	-9,07
		15	15,78	0,43	2,72	5,23
		40	39,37	1,32	3,35	-1,58
		Ácido clorogénico	Precisão Interdia	2	2,33	0,05
5	5,65			0,34	6,02	12,96
10	10,33			0,07	0,68	3,26
20	19,63			0,14	0,71	-1,87
30	27,06			0,28	1,03	-9,80
Precisão Intradia	50		51,24	0,73	1,42	2,47
	2		1,63	0,12	7,36	-18,46
	15		15,57	0,45	2,89	3,78
	40		39,38	2,05	5,21	-1,54
	Epicatequina		Precisão Interdia	2	2,27	0,02
5		5,69		0,1	1,76	13,87

		10	10,08	0,31	3,08	0,76	
		20	19,07	0,07	0,37	-4,66	
		30	29,02	0,04	0,14	-3,28	
		50	50,87	0,53	1,04	1,73	
	Precisão Intradia	2	2,11	0,18	8,53	5,44	
		15	14,67	1,43	9,75	-2,20	
		40	36,25	1,12	3,09	-9,37	
Cianidina	Precisão Interdia	2	1,86	0,07	3,76	-6,91	
		5	5,00	0,25	5,00	0,06	
		10	10,01	0,49	4,90	0,08	
		20	18,84	2,73	14,49	-5,81	
		30	28,31	1,6	5,65	-5,63	
			50	48,42	3,32	6,86	-3,16
		Precisão Intradia	2	1,95	0,02	1,03	-2,31
			15	14,37	0,77	5,36	-4,23
			40	41,35	2,01	4,86	3,38
	Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	Precisão Interdia	2	2,27	0,31	13,66	13,74
			5	5,69	0,48	8,44	13,87
			10	10,08	0,77	7,64	0,76
20			19,07	1,22	6,40	-4,66	
30			29,02	0,96	3,31	-3,28	
			50	50,87	0,72	1,42	1,73
		Precisão Intradia	2	2,05	0,08	3,90	2,47
			15	16,76	2,4	14,32	-6,50
			40	41,37	2,85	6,89	-7,26
Cianidina-3-O-glicosídeo		Precisão Interdia	2	2,27	0,34	14,98	13,74
			5	5,69	0,23	4,04	13,87
			10	10,08	0,17	1,69	0,76
	20		19,07	0,73	3,83	-4,66	
	30		29,02	0,6	2,07	-3,28	
			50	50,87	0,43	0,85	1,73
		Precisão Intradia	2	1,68	0,15	8,93	-15,80
			15	14,68	0,6	4,09	-2,14
			40	42,19	1,27	3,01	5,49
	Quercetina	Precisão Interdia	2	2,21	0,2	9,05	10,57
			5	5,44	0,11	2,02	8,75
			10	9,97	0,14	1,40	-0,34
20			19,59	0,07	0,36	-2,03	
30			29,23	0,42	1,44	-2,55	
			50	50,65	0,28	0,55	1,31
		Precisão Intradia	2	2,23	0,1	4,48	11,32
			15	15,25	0,83	5,44	1,66
			40	42,13	1,81	4,30	5,32

## 4. Digestão *in vitro*

O processo digestivo *in vitro* seguiu uma metodologia descrita na bibliografia com algumas adaptações (47,51). Foram preparados fluidos para simular o efeito fisiológico da saliva, fluido gástrico, duodenal e biliar na digestão, usando as quantidades indicadas na tabela 5. Foram pesadas as quantidades referidas, individualmente, sendo reservadas as mesmas até ao momento de preparação das soluções, para garantir a manutenção das condições e qualidade das mesmas. Todos os reagentes foram mantidos em condições ideais de armazenamento, isolados, até à realização das experiências.

Tabela 5: quantidades pesadas para preparação dos fluidos digestivos.

	SALIVA		GÁSTRICO		DUODENAL		BÍLIS	
	Constituinte	Quantidade	Constituinte	Quantidade	Constituinte	Quantidade	Constituinte	Quantidade
Inorgânico	KCl	896 mg	NaCl	2752,21 mg	NaCl	7012 mg	NaCl	5259 mg
	KSCN	200 mg	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	266,4 mg	NaHCO <sub>3</sub>	3388 mg	NaHCO <sub>3</sub>	5785,01 mg
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	888 mg	KCl	824,32 mg	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80 mg	KCl	376,32 mg
	NaSO <sub>4</sub>	570 mg	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	399,6 mg	KCl	564,48 mg	HCl 37%	0,150 mL
	NaCl	298,01 mg	NH <sub>4</sub> Cl	306 mg	MgCl <sub>2</sub>	50 mg		
	NaHCO <sub>3</sub>	1694 mg	HCl 37%	6,5 mL	HCl 37%	0,180 mL		
Orgânico	Ureia	200 mg	Glucose	650 mg	Ureia	100 mg	Ureia	250 mg
			Ác. Glucurónico	20 mg				
			Ureia	85 mg				
Adicionar	Alfa-amilase	290 mg	BSA	1 g	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	199,8 mg	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	222 mg
	Mucina	25 mg	Pepsina	2,5 g	BSA	1 g	BSA	1,8 g
	Ácido úrico	15 mg	Mucina	3 g	Pancreatina	9 g	Bile	30 g
					Lipase	1,5 g		
pH	6,8		1,3		8,1		8,2	

1 g do extrato resultante do fruto liofilizado foi dissolvido em 10 mL de água desionizada. Esta quantidade corresponde aproximadamente a 6 g de fruta fresca. Adicionaram-se 6 mL de fluido salivar simulado, incubando a 37° C durante 5 minutos e com agitação orbital de 90 rpm. O pH deste fluido foi verificado, encontrando-se o mesmo a 6,8. No final deste procedimento foi recolhida uma alíquota para posterior análise. De seguida foram adicionados 12 mL de fluido gástrico simulado, incubando-se durante 2 horas a 37° C com agitação constante em agitador orbital, 90 rpm. Procedeu-se à medição do pH, situando-se este em 1,3. No final do processo digestivo gástrico (após 120 minutos) foi recolhida uma alíquota para posterior análise. Posteriormente, foram adicionados 12 mL de fluido duodenal simulado, juntamente com 6 mL de fluido biliar simulado e 2 mL de solução bicarbonato de sódio 1 M, mantendo-se a mesma temperatura e agitação. Verificou-se o pH, encontrando-se este a 8,2. Após 120 minutos, no final do procedimento experimental, foi recolhida uma alíquota para posterior análise. O volume de cada uma das alíquotas recolhidas foi de 1 mL.

Todas as alíquotas foram colocadas em gelo imediatamente após a recolha, sendo de seguida congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , durante um mínimo de 30 minutos e então sonicadas (Transsonic 460/H, Elma, Suíça) a  $4^{\circ}\text{C}$ , em banho de gelo, durante 30 minutos. Posteriormente foram centrifugadas durante 10 minutos a 10000 rpm (Hettich, Mikro 200R). Estes passos permitem parar a atividade enzimática e facilitar a separação dos componentes, bem como purificar a amostra. Foi então recolhido o sobrenadante, que foi filtrado em filtro de poro  $0,22\ \mu\text{m}$  de acetato de celulose (VWR International, Portugal) e de seguida sujeito a quantificação pelo procedimento cromatográfico anteriormente descrito.

As experiências foram realizadas em quadruplicado, em passos consecutivos. Apresenta-se na figura 19 de forma esquematizada o procedimento realizado.

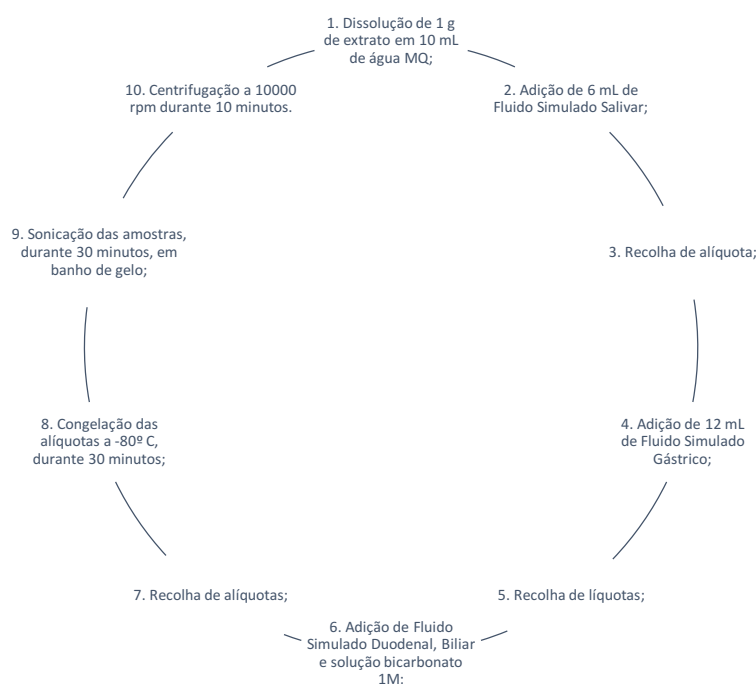


Figura 19: apresentação esquemática do modelo experimental digestivo *in vitro*.

## 5. Quantificação e Caracterização Através de HPLC-DAD

### 5.1. Otimização do Processo de Diluição do Extrato Prévio à Quantificação dos Compostos Fenólicos em Amostras de Cereja

A quantificação inicial do extrato do fruto de *Prunus avium L.*, antes da adição de qualquer fluido digestivo, foi feita a partir da pesagem de 0,5 g de extrato puro. Esta quantidade foi dissolvida em 10 mL de metanol e posteriormente filtrada com filtro de poro  $0,22\ \mu\text{m}$  de acetato de celulose (VWR International, Portugal). Posteriormente, foram feitas diversas diluições permitindo encontrar a diluição mais favorável para a identificação e quantificação

dos compostos em estudo no extrato inicial e no extrato digerido. As amostras foram diluídas e preparadas em *vials* de acordo com as quantidades referidas na tabela 6.

Tabela 6: diluições efetuadas para a realização da análise.

<b>Identificação</b>	<b>Diluições</b>
<b>E1</b>	1:25
<b>E2</b>	1:12,5
<b>E3</b>	1:6,25
<b>E4</b>	1:3,125

O procedimento de quantificação foi realizado para as 6 variedades (tendo a variedade *Saco* duas colheitas distintas, 2015 e 2017) de cerejas em estudo, sem qualquer alteração.

As amostras resultantes do processo digestivo simulado não requereram qualquer processamento adicional, tendo sido injetadas após a filtração.

### III. Resultados e Discussão

#### 1. Preparação do extrato de *Prunus avium L.*

##### 1.1. Liofilização do Fruto de *Prunus avium L.*

Foi determinado o rendimento da liofilização pela comparação do peso em fresco e do peso liofilizado, permitindo assim determinar a percentagem de água perdida, conforme a equação 2. A liofilização apenas foi executada pelo autor na variedade *Saco 2017*, sendo que nas restantes variedades o fruto foi obtido já liofilizado, resultado do trabalho de M. B. Catalão (12), apresentando-se os rendimentos médios obtidos. Os resultados encontram-se na tabela 7. Na figura 20, encontra-se um exemplo do fruto já liofilizado e na figura 21 um exemplo do fruto fresco.

Tabela 7: rendimento da liofilização das diferentes variedades.

Variedade	Rendimento
<i>Saco 2017</i>	18,39 %
<i>Saco 2015</i>	28,19%
<i>Primulat</i>	19,77%
<i>Brooks</i>	22,53%
<i>Earlise</i>	13,21%
<i>Summit</i>	21,20%
<i>Sweetheart</i>	27,13%



Figura 20: fruto de *Prunus avium L.*, liofilizado, variedade *Primulat*.



Figura 21: fruto de *Prunus avium L.* fresco, variedade desconhecida. CC BY-SA 3.0, Benjamint444.

##### 1.2. Extração Metanólica do Fruto Liofilizado.

O fruto liofilizado foi sujeito a um processo de extração sendo pesado nos vários momentos do processo e o rendimento da extração foi de seguida calculado de acordo com a equação 3. O rendimento da extração permite determinar a eficácia do processo. Esta determinação parte do pressuposto que o extrato se encontra completamente isento de água, para poder ser comparado com a fruta liofilizada. No entanto, a experiência demonstrou que a total

secagem do extrato, com recurso a liofilizador, implica uma modificação significativa das suas características organoléticas, tornando-se difícil a sua posterior manipulação. Assim admite-se a possibilidade de existência de alguma água residual nos extratos obtidos, sendo que nas condições de secagem utilizadas em evaporador rotativo a uma temperatura de 35° C, escolhida para evitar a degradação das antocianinas e antocianidinas, seria difícil a evaporação total da água residual. Os rendimentos obtidos encontram-se na tabela 8.

Tabela 8: rendimento da extração de 6 variedades de cereja oriundas do Fundão.

Variedade	Rendimento
<i>Saco 2017</i>	93,89 %
<i>Saco 2015</i>	93,65 %
<i>Primulat</i>	97,59 %
<i>Summit</i>	85,10 %
<i>Earlise</i>	78,35 %
<i>Sweetheart</i>	98,56 %
<i>Brooks</i>	96,98 %

Na figura 22 pode observar-se o aspeto do extrato produzido, para a variedade *Saco*, a título de exemplo, e na figura 23 o aspeto inicial duma cereja liofilizada imersa no solvente de extração. Após este procedimento, a cereja perde grande parte da sua coloração característica, ficando com uma cor rosa pálida.



Figura 22: 0,5 g de extrato do fruto da variedade *Saco*.  
Figura 23: cereja antes do início da extração.

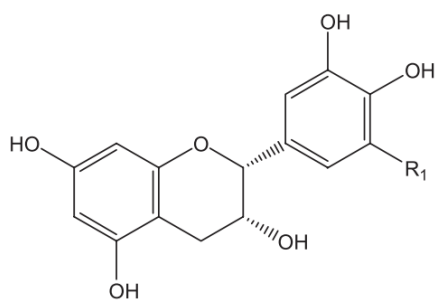
## 2. Caracterização dos Compostos Fenólicos dos Extratos

### 2.1. Seleção dos Compostos Fenólicos usados como padrão

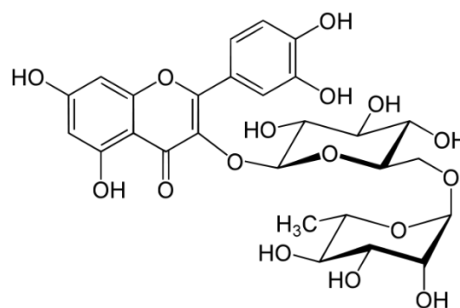
Foi selecionado um conjunto de nove compostos fenólicos, que de acordo com a bibliografia existente, parecem estar presentes nas cerejas. Pretendeu-se ainda selecionar compostos que possam representar metabolitos provenientes dos compostos fenólicos após a digestão, como compostos fenólicos simples, antocianinas e antocianidinas. O objetivo seria obter um conjunto razoavelmente representativo e que permitisse uma extrapolação plausível dos

resultados. Compreender a forma como diferentes classes de compostos fenólicos respondem perante as alterações bioquímicas no meio digestivo permite compreender melhor a bioacessibilidade e a biodisponibilidade destes compostos e entender o seu potencial real na saúde humana.

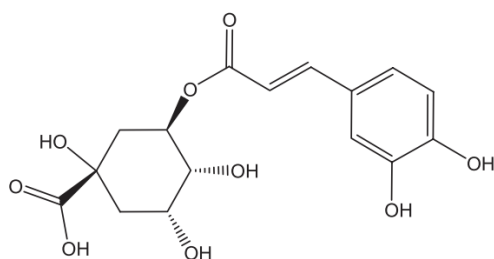
Assim, com base nestes pressupostos, os compostos fenólicos escolhidos foram a epicatequina, rutina, ácido clorogénico, ácido p-coumárico, cianidina-3-O-glicosídeo, quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e ácido gálico (3,5,9,84). Imagens elucidativas destes compostos encontram-se na figura 24.



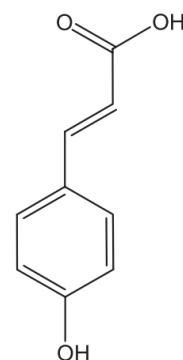
Epicatequina,  $R_1=H$



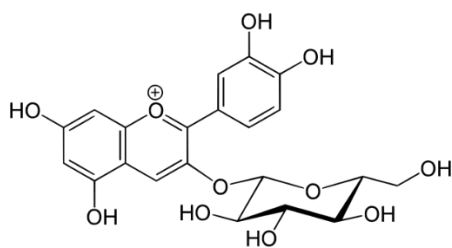
Rutina



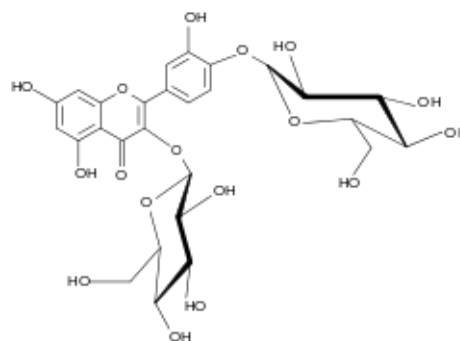
Ácido clorogénico



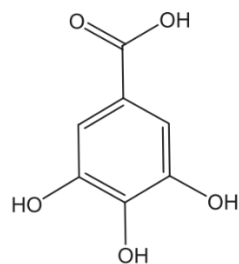
Ácido p-coumárico



Cianidina-3-O-glicosídeo



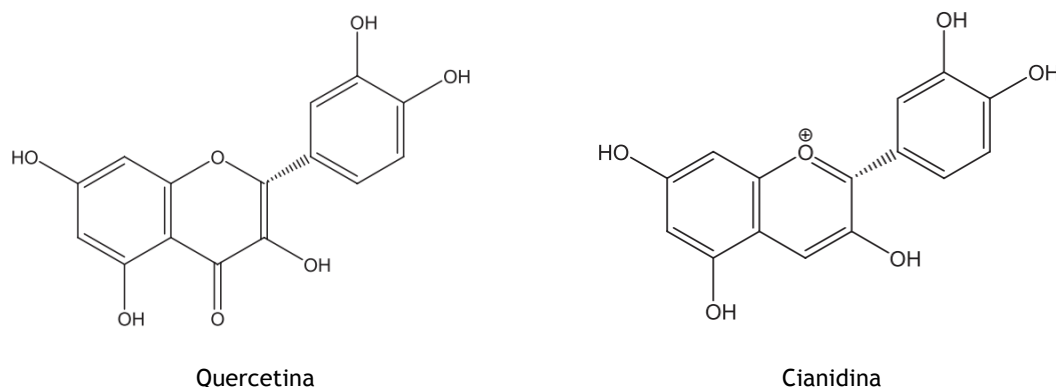
Quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo



Ácido gálico

Figura 24: estrutura química dos compostos fenólicos estudados. Adaptado (15). CC BY-AS 3-0, Pancrat, Yikrazuul.

Tal como já foi referido, de forma a compreender a eficácia do processo de digestão *in vitro*, foi ainda necessário encontrar prováveis metabolitos de compostos presentes nas cerejas, que, de forma previsível, indiquem a extensão do processo de metabolização. Deste modo, a cianidina e a quercetina, derivando de compostos glicosídeos (54), mostram-se adequados para o objetivo pretendido, estando representadas na figura 25 (85).



Quercetina

Cianidina

Figura 25: estrutura química dos padrões selecionados. Adaptado (15).

## 2.2. Caracterização do Extrato de Seis Variedades de Cerejas do Fundão

Foi selecionada a diluição de extrato mais apropriada para quantificação, conforme descrito anteriormente, que a experiência mostrou corresponder ao quantificador E3 (1:6,25). Segundo o protocolo anteriormente descrito, (II. 2. Extração a partir do fruto liofilizado), procedeu-se á extração dos compostos fenólicos para cada uma das variedades de cereja em estudo. Para cada uma destas variedades foram realizadas três réplicas. Os resultados apresentados nas tabelas 9 a 15 correspondem às médias dessas quantificações e apresentam-se em miligramas de composto por 100 gramas de fruta fresca. Foi preparado um gráfico para cada uma das tabelas, auxiliando visualmente a ordem de grandeza das quantificações.

A título exemplificativo, na figura 26, mostra-se o aspeto dos extratos obtidos para as diferentes variedades de cereja das soluções mãe obtidas da dissolução de 0,5 g de extrato puro em 10 mL de metanol, para estas variedades.

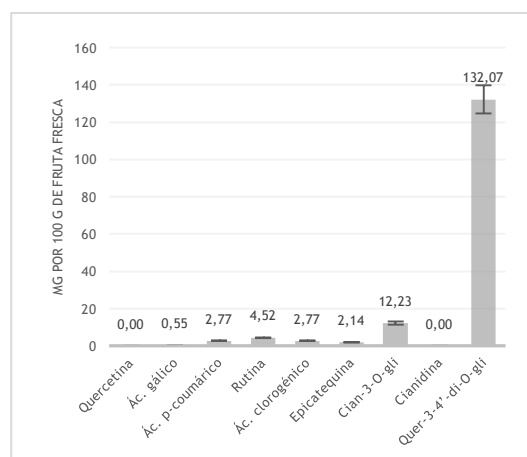


Figura 26: aspeto das soluções mãe de 0,05 g/mL, da esquerda para a direita: Sweetheart, Earlise, Summit, Primulat, Brooks, Saco 2015, Saco 2017.

### Primulat

Tabela 9: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Primulat*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

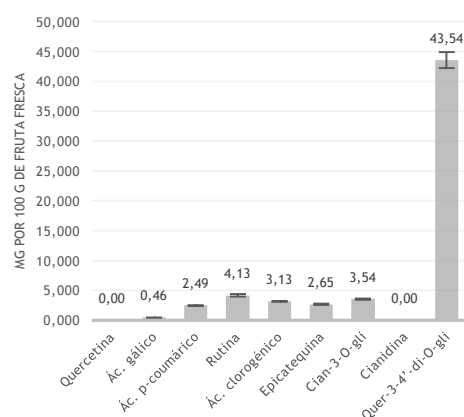
Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,55 ± 0,04
Ác. p-coumárico	2,77 ± 0,03
Rutina	4,52 ± 0,19
Ác. clorogénico	2,78 ± 0,02
Epicatequina	2,14 ± 0,16
Cianidina-3-O-glicosídeo	12,23 ± 0,79
Cianidina	Não detetado
Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	132,07 ± 7,51



### Summit

Tabela 10: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Summit*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,46 ± 0,00
Ác. p-coumárico	2,49 ± 0,01
Rutina	4,13 ± 0,21
Ác. clorogénico	3,13 ± 0,06
Epicatequina	2,65 ± 0,09
Cianidina-3-O-glicosídeo	3,54 ± 0,10
Cianidina	Não detetado

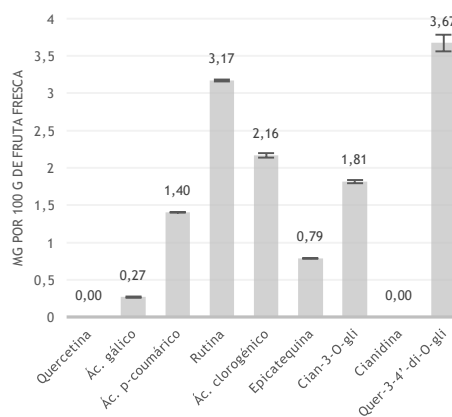


Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	43,54 ± 1,32
---------------------------------	--------------

### Earlise

Tabela 11: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Earlise*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

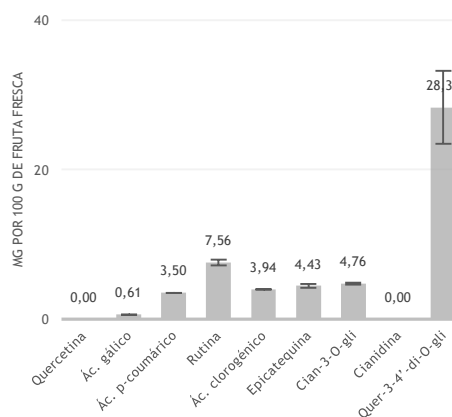
Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,27 ± 0,01
Ác. p-coumárico	1,40 ± 0,01
Rutina	3,17 ± 0,02
Ác. clorogénico	2,16 ± 0,03
Epicatequina	0,79 ± 0,00
Cianidina-3-O-glicosídeo	1,81 ± 0,02
Cianidina	Não detetado
Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	3,67 ± 0,12



### Sweetheart

Tabela 12: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Sweetheart*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

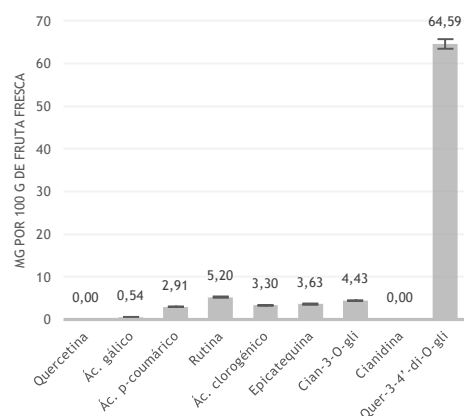
Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,61 ± 0,00
Ác. p-coumárico	3,50 ± 0,00
Rutina	7,56 ± 0,38
Ác. clorogénico	3,94 ± 0,07
Epicatequina	4,43 ± 0,29
Cianidina-3-O-glicosídeo	4,76 ± 0,13
Cianidina	Não detetado
Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	28,31 ± 4,89



### Brooks

Tabela 13: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Brooks*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

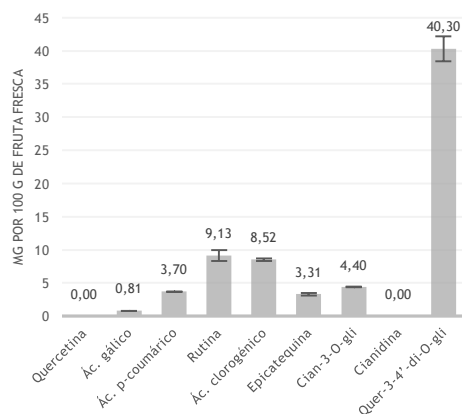
Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,54 ± 0,01
Ác. p-coumárico	2,91 ± 0,02
Rutina	5,20 ± 0,15
Ác. clorogénico	3,30 ± 0,03
Epicatequina	3,63 ± 0,14
Cianidina-3-O-glicosídeo	4,43 ± 0,06
Cianidina	Não detetado
Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	64,59 ± 1,13



### Saco 2015

Tabela 14: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Saco 2015*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

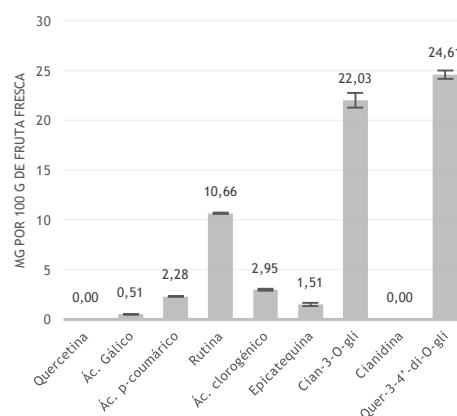
Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,81 ± 0,02
Ác. p-coumárico	3,70 ± 0,03
Rutina	9,13 ± 0,80
Ác. clorogénico	8,52 ± 0,20
Epicatequina	3,31 ± 0,18
Cianidina-3-O-glicosídeo	4,40 ± 0,07
Cianidina	Não detetado
Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	40,30 ± 1,87



### Saco 2017

Tabela 15: identificação e quantificação de compostos fenólicos para a variedade *Saco 2017*. Valores expressos em miligramas por 100 gramas de fruta fresca. Gráfico ilustrativo da mesma tabela.

Composto	Quantificação
Quercetina	Não detetado
Ác. gálico	0,51 ± 0,01
Ác. p-coumárico	2,28 ± 0,01
Rutina	10,66 ± 0,07
Ác. clorogénico	2,95 ± 0,10
Epicatequina	1,51 ± 0,15
Cianidina-3-O-glicosídeo	22,03 ± 0,74
Cianidina	Não detetado
Quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo	24,61 ± 0,42



Conforme referido, todos os dados são apresentados em mg por g de fruta fresca. Apesar das amostras de *Primulat*, *Brooks*, *Summit*, *Earlise*, *Sweetheart* e *Saco 2015* terem sido obtidas na forma liofilizada, foram utilizados os dados de M. B. Catalão (12) para a conversão dos resultados a fruta fresca. Para estas seis variedades, verifica-se a ausência de quercetina e cianidina, o que é compatível com a bibliografia, embora exista pelo menos um estudo que identifica quantidades vestigiais de cianidina (84). A figura 27, abaixo, permite uma comparação rápida entre as variedades em estudo, para cada um dos compostos analisados.

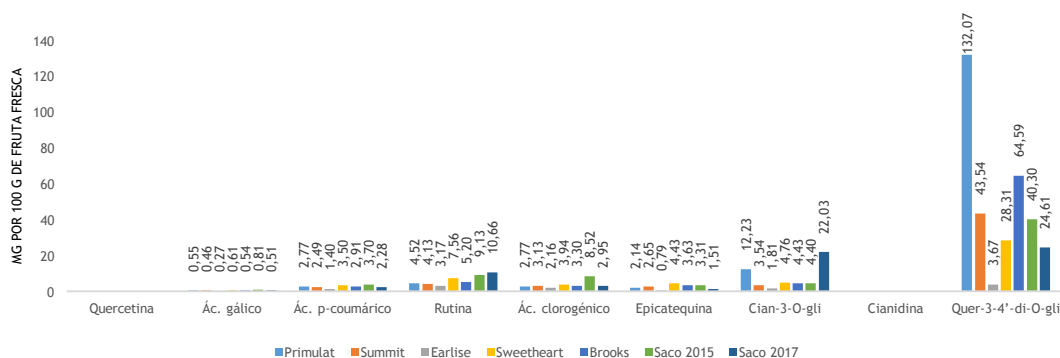


Figura 27: comparação para cada composto das seis variedades em estudo. Valores em mg por 100 g de fruta fresca. Desvio padrão omitido para simplificação.

A quantidade de quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo, um flavonol incolor, é um dos compostos cuja quantidade mais varia, desde os 3,67±0,12 mg por 100 g de fruto fresco da variedade *Earlise* até aos 132,07±7,51 mg por 100 g de fruto fresco da variedade *Primulat*. É este o composto que apresenta maior quantidade. Também a cianidina-3-O-glicosídeo varia consideravelmente entre as variedades. Este composto, uma antocianina, uma das mais frequentes em cerejas, apresenta maior teor na variedade *Saco 2017* e menor em *Earlise*. O

trabalho de M. B. Catalão (12), tendo quantificado o teor de fenóis totais nas mesmas variedades, verificou que também a variedade *Earlise* apresenta o menor teor nestes compostos, tendo apurado a variedade *Saco* colheita tardia como tendo o maior teor em fenóis. Como o nosso estudo incidiu sobre tipos particulares de compostos fenólicos, e não sobre fenóis totais, uma comparação direta não pode ser realizada, no entanto, podemos afirmar, como referido, que a variedade que apresentou menores teores dos compostos estudados foi a *Earlise*, sendo os resultados concordantes (8,18,49).

A rutina, o ácido clorogénico e o ácido p-coumárico são compostos comuns e na bibliografia encontram-se vários exemplos de estudos que incidem sobre estes compostos. As variedades de cereja do Fundão não têm sido alvo de estudos similares, no entanto foi possível comparar a variedade *Primulat*, relativamente ao teor de rutina, ácido clorogénico e epicatequina, relativamente ao trabalho de V. Usenik *et al.* (7).

No estudo desenvolvido, foi possível verificar que as quantidades de rutina, epicatequina e ácido clorogénico determinadas foram de  $4,52 \pm 0,19$ ,  $2,14 \pm 0,16$  e  $2,78 \pm 0,02$  mg por 100 gramas de fruta fresca, respetivamente, vs. as quantidades obtidas por Usenik *et al.* que foram de  $2,81 \pm 0,43$ ,  $4,51 \pm 0,00$  e  $0,60 \pm 0,06$ . É notório que nas variedades de cerejas produzidas na região do Fundão as quantidades destes compostos são consideravelmente mais elevadas.

Ballistreri *et al.* (9) quantificaram o teor de ácido clorogénico da variedade *Sweetheart*, sendo este valor foi de  $1,46 \pm 0,10$  mg por 100 g de fruta fresca e no nosso trabalho a quantidade foi de  $3,94 \pm 0,07$  mg por 100 de fruta fresca para a mesma variedade.

Um outro trabalho, publicado por A. T. Serra *et al.* (5), estudou os compostos epicatequina, ácido clorogénico, rutina e cianidina-3-O-glicosídeo para as variedades *Saco* e *Summit*, entre outras. Para facilitar a leitura e comparação dos mesmos, foi elaborada a seguinte tabela (tabela 16), abaixo. Verifica-se que também neste estudo a variedade *Saco* apresenta maior teor de compostos fenólicos. No entanto, não é possível realizar comparações diretas em virtude das diferentes condições experimentais e diferentes amostras. As cerejas do estudo referido foram também obtidas da Cova da Beira em junho de 2008.

Tabela 16: comparação entre os resultados obtidos e bibliografia publicada. Todos os valores expressos em mg por 100 g de fruta liofilizada.

Variedade	Composto	R. Ramos (mg/100 g de fruta liofilizada)	A.T. Serra <i>et al.</i> (mg/100 g de fruta liofilizada)
<i>Saco 2017</i>	Epicatequina	$8,20 \pm 0,81$	9,4
	Ácido clorogénico	$16,07 \pm 0,51$	8,7

<b>Summit</b>	Rutina	57,97±0,36	26,6
	Cianidina-3-O-glicosídeo	119,84±4,05	55,6
	Epicatequina	12,45±0,44	0,1
	Ácido clorogénico	14,69±0,27	1,9
	Rutina	19,41±1,00	7,8
	Cianidina-3-O-glicosídeo	16,63±0,46	2,9

A bibliografia existente permitiu verificar que os compostos fenólicos das diferentes variedades de cereja da região Cova da Beira apresentam ordens de grandeza similares ao referido em trabalhos prévios.

Comparando em particular as variedades *Saco 2015* e *Saco 2017*, cujo gráfico compilado deixamos abaixo para mais fácil compreensão, na figura 28, verifica-se que a quantidade de compostos fenólicos é similar entre as diferentes colheitas, com a exceção da cianidina-3-O-glicosídeo e da quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo.

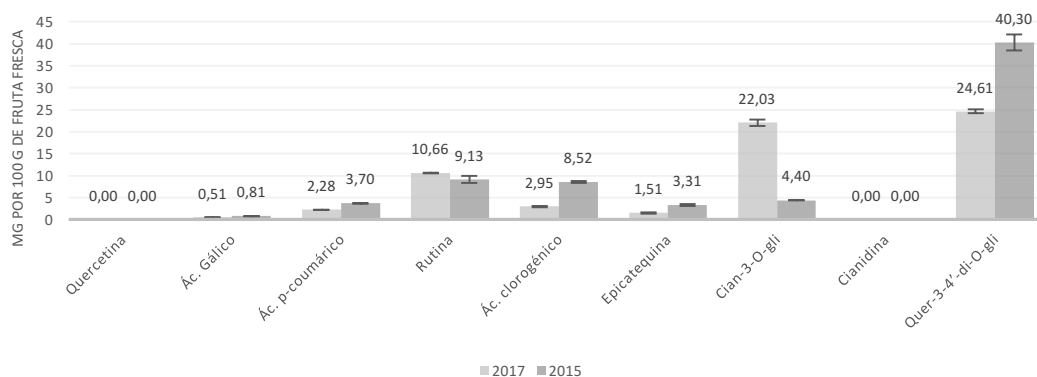


Figura 28: comparação direta entre as variedades *Saco*, colheita de 2017 e de 2015.

A principal diferença reside na cianidina-3-O-glicosídeo, cuja quantidade é sensivelmente 4 vezes menor para a colheita de 2015, para cerejas que apresentam características organolépticas, nomeadamente a cor, bastante semelhantes. Verifica-se que as antocianinas são compostos extremamente sensíveis, podendo ser danificadas por temperaturas elevadas (superiores a 37° C), ou exposição prolongada à luz. Embora as experiências tenham sido realizadas em condições ideais, o autor não pode garantir que a cereja liofilizada a que teve acesso para extração da variedade *Saco 2015*, tenha sido sempre mantida em tais condições, podendo este facto explicar a notável discrepância de valores neste composto. Os demais compostos apresentam variações dentro do expectável.

### 3. Caracterização dos Compostos Fenólicos Após Processo Digestivo

#### 3.1. Avaliação Global do Processo Digestivo

O processo digestivo simulado foi aplicado apenas no extrato da variedade *Saco*, colheita de 2017, tendo sido escolhido não apenas pela disponibilidade da amostra, mas por constituir uma espécie característica da região.

As soluções digestivas simuladas, de acordo com as especificações referidas, foram preparadas no dia da análise, mediante a mistura da fração orgânica e inorgânica, sendo mantidas em frio, 4° C, até ao início da experiência. Apenas momentos antes foram individualmente aquecidas até 37° C. Nas figuras seguintes, 29 a 32, é possível visualizar as soluções preparadas.



Figura 29: fluido simulado salivar.



Figura 30: fluido simulado gástrico.



Figura 31: fluido simulado duodenal.



Figura 32: fluido simulado biliar.

O procedimento digestivo realizado em quadruplicado e de forma consecutiva permitiu uma primeira análise às características do extrato e suas modificações enquanto sujeito ao mesmo. Como referido, a digestão é um processo fisiologicamente agressivo, sendo difícil replicar todas as condicionantes em estudos *in vitro*. Nas figuras seguintes, figuras 33 a 36, apresentam-se imagens relativas às diferentes etapas do processo digestivo do extrato da variedade *Saco*, colheita de 2017.



Figura 33: aspeto final do extrato dissolvido após digestão gástrica.

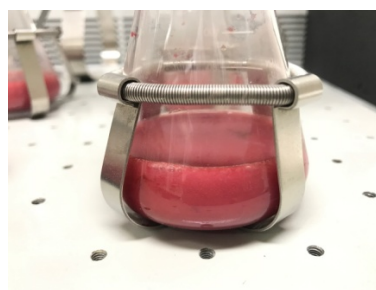


Figura 34: aspeto do extrato dissolvido após adição do fluido duodenal.



Figura 35: aspeto do extrato dissolvido após adição da solução bicarbonato 1M.

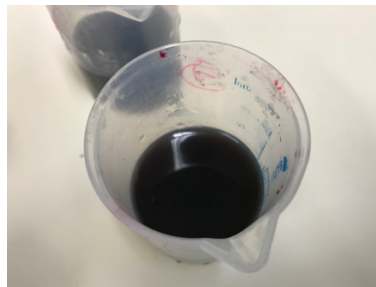


Figura 36: aspeto final do extrato dissolvido após digestão intestinal.

Foram recolhidas alíquotas de 1 mL durante a totalidade do processo (um total de 12 amostras para análise). Na figura 37, observamos o aspeto de 3 alíquotas recolhidas correspondendo ao momento final de cada uma das etapas do processo digestivo. É notória a diferença na coloração, podendo esta ser indicativa de alguma transformação química e/ou enzimática.

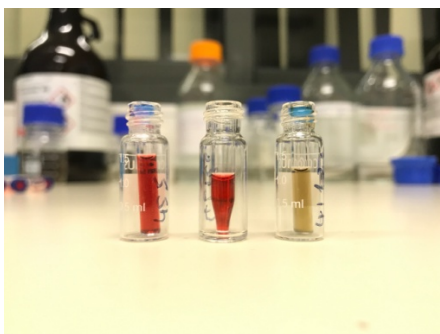


Figura 37: aspeto de cada um dos extratos após cada uma das etapas do processo de digestão. No lado esquerdo, final da digestão salivar, ao centro, final da digestão gástrica e à direita, final da digestão intestinal.

## 3.2. Quantificação dos Compostos Fenólicos no Extrato Após o Processo Digestivo *in vitro*

### 3.2.1. Experiência 1 - Recolha Temporal de Alíquotas

Num primeiro ensaio, tentou-se utilizar um método sistemático de recolha de alíquotas. Esta experiência foi feita em quadruplicado, recorrendo a um banho termostaticado de água e com agitação unilateral fixa a 50 rpm. Esta agitação verificou-se manifestamente insuficiente, no entanto, velocidades superiores poderiam incorrer em risco de entrada da água do banho para o copo onde se encontrava a amostra. Assim, para cada um dos momentos digestivos foram recolhidas diversas alíquotas, em momentos previamente definidos, conforme indicado na tabela 17. Nos gráficos da figura 38, os momentos encontram-se com a identificação referida aqui.

Tabela 17: momentos de recolha de alíquotas durante o processo digestivo *in vitro*.

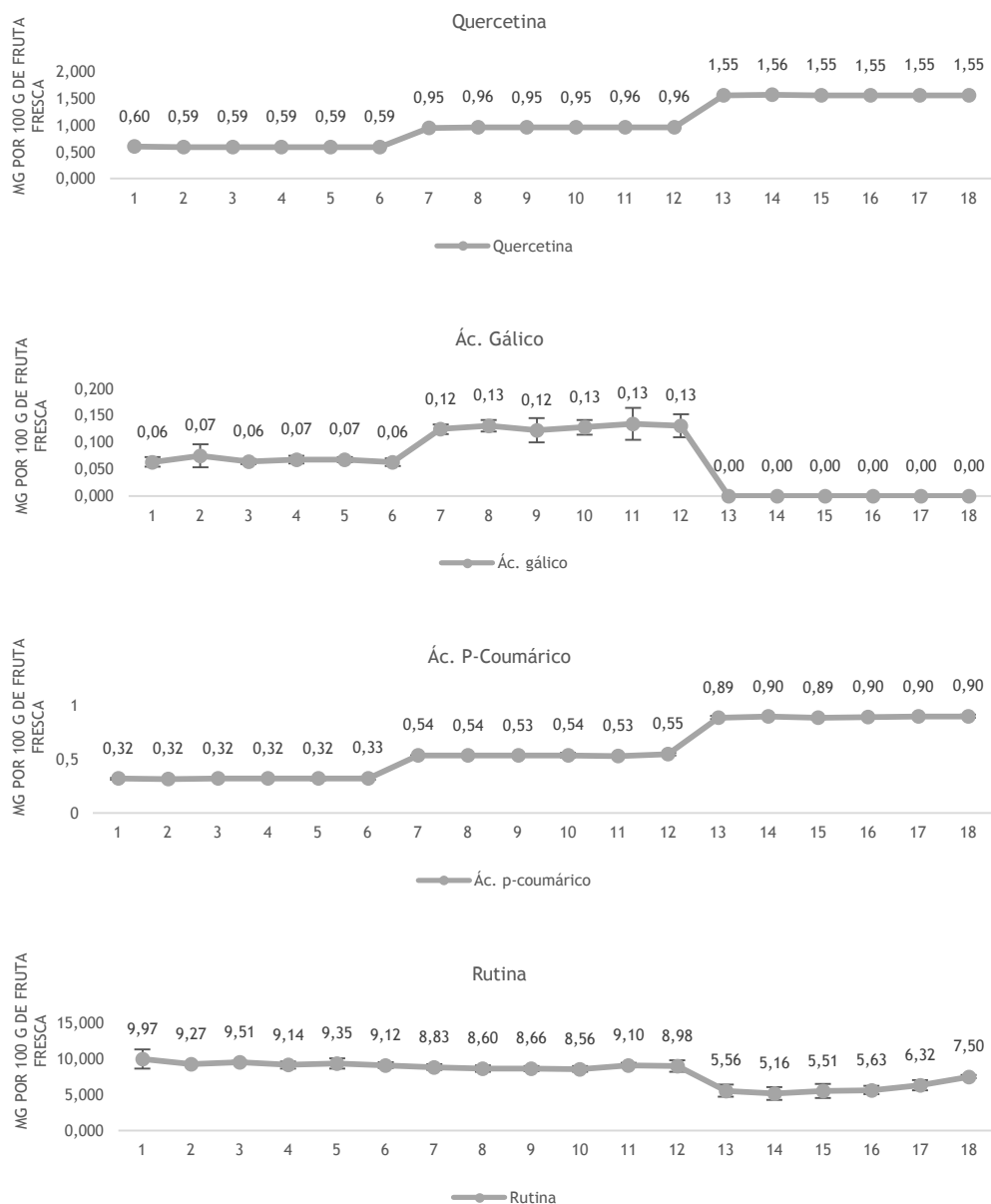
Fase Digestiva	Identificação	Tempo de Recolha
Saliva	1	0 min
	2	0,5 min
	3	1 min
	4	2 min
	5	3,5 min
	6	5 min
Gástrica	7	0 min
	8	15 min
	9	30 min
	10	60 min
	11	90 min
	12	120 min
Intestinal	13	0 min
	14	15 min
	15	30 min
	16	60 min
	17	90 min
	18	120 min

Como dificuldade adicional, refere-se a incapacidade em garantir que a temperatura se mantivesse nos 37° C estabelecidos. Além disso, o facto de ser necessário recolher alíquotas em períodos curtos de tempo, para posterior quantificação por HPLC-DAD, poderia induzir erros, nomeadamente a nível da pipetagem. Desta forma, procedeu-se à recolha de um volume de 250 µL de extrato, que foi congelado, sonificado e centrifugado conforme indicado anteriormente antes de ser analisado cromatograficamente.

Outras das dificuldades reside no facto de uma quantidade tão pequena não poder ser filtrada, acarretando o perigo de saturar a coluna cromatográfica. A não filtração da amostra, por outro lado, dá origem a um cromatograma de difícil caracterização, principalmente em amostras complexas como esta.

O intuito deste ensaio foi analisar individualmente cada um dos passos do processo digestivo, de forma não consecutiva. Isto é, num primeiro momento, analisou-se apenas a evolução dos compostos durante a digestão salivar, sendo interrompido aí o procedimento. Depois, noutro ensaio, realizou-se a digestão salivar, seguida pela digestão gástrica, sendo aí quantificada e finalmente num terceiro momento executa-se a digestão salivar, gástrica e de seguida a intestinal, quantificando-se nesse momento esta última. Os resultados desta experiência encontram-se descritos nos gráficos da figura 38. De realçar que para alguns dos compostos em estudo a concentração encontra-se abaixo do LLOQ, particularmente na fase intestinal,

onde a diluição é maior, sendo por isso impossível a sua quantificação. Particularmente nestes casos, a sobreposição e multiplicidade de picos já referida prejudica grandemente a possibilidade de quantificação e caracterização, podendo ser este o principal responsável pela dificuldade na identificação. A figura 39 corresponde à sobreposição dos gráficos da figura 38, facilitando a comparação.



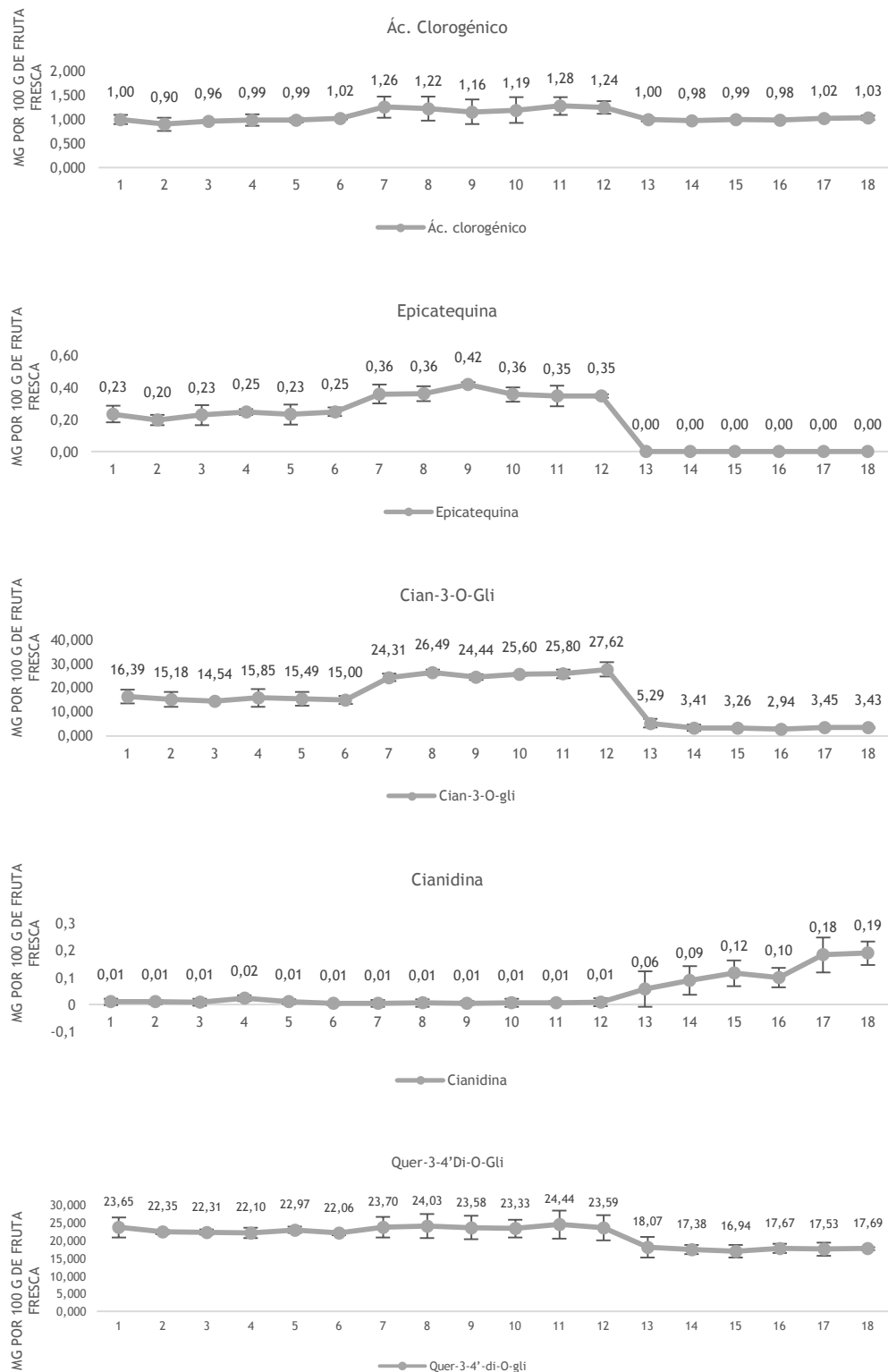


Figura 38: gráficos correspondentes à quantificação *versus* tempo de cada um dos compostos em estudo, barra vertical indicativa do desvio padrão. Todas as quantificações encontram-se expressas em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.

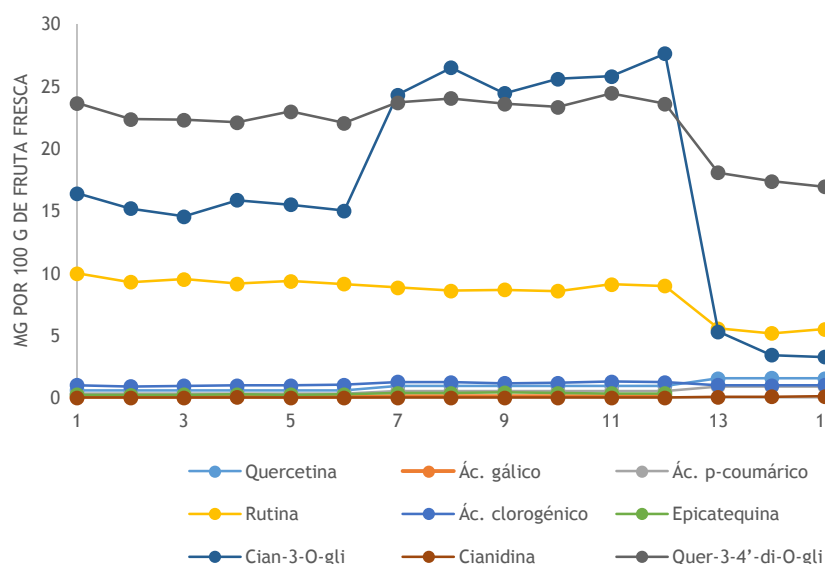


Figura 39: comparação entre os diversos compostos; desvio padrão e etiqueta de dados omitida para simplificação.

De uma forma geral, verificamos que o desvio padrão é significativo em muitas das determinações, ressalvando-se que estas correspondem à média dos quadruplicados executados. Como consequência, os coeficientes de variação estão frequentemente acima dos 15% recomendados. A interpretação destes dados passa pelos motivos já referidos, que levaram a que os resultados obtidos tenham algum grau de variabilidade, implicando que a precisão dos resultados possa ser reduzida.

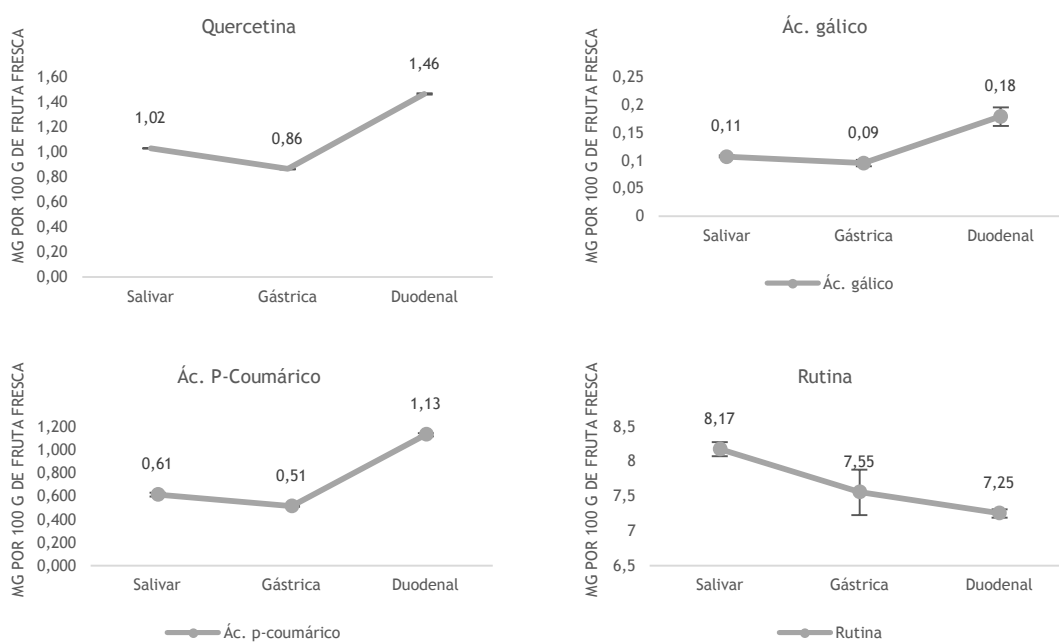
Ainda assim, com base nos resultados obtidos, podemos constatar que as principais alterações nas quantificações se verificam nos momentos em que houve adição de um novo fluido digestivo, sendo a alteração temporal a partir desse momento praticamente depreciável. Constatou-se que a maioria dos compostos fenólicos é resistente ao processo digestivo, com a exceção dos glicosídeos em estudo, a cianidina-3-O-glicosídeo e quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo cuja degradação é evidente e demonstrada pelos resultados obtidos. Também a rutina (quercetina-3-O-rutinósido), outro glicosídeo, diminui em menor extensão. Seria de esperar que a degradação destes compostos originasse um aumento na concentração de cianidina e quercetina, no entanto, estes valores não aumentaram de forma proporcional à diminuição dos derivados glicosilados. É de supor que sejam originados outros metabolitos, não correspondendo às estruturas da cianidina e quercetina. Outros compostos, como o ácido clorogénico ou a rutina, diminuem durante o procedimento experimental. Não foi possível realizar a quantificação de epicatequina e do ácido gálico devido ao facto de estes se encontrarem em quantidades inferiores ao LLOQ estabelecido em 2 µg/mL.

Outros compostos, como a quercetina, a cianidina ou o ácido p-coumárico aumentam no decorrer do processo digestivo. É expectável que compostos como a rutina, a cianidina-3-O-

glicosídeo e a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo, ao serem degradados durante o processo digestivo, possam ter como metabolitos a cianidina ou a quercetina, sendo esta a explicação mais plausível para o achado.

### 3.2.2. Experiência 2 - Recolha de Alíquotas Final ao Processo Digestivo

Tendo em conta os resultados apresentados na “Experiência 1”, optou-se por repetir os ensaios, recorrendo ao protocolo definido na Parte II, “Procedimento Experimental”. Destarte, recorreu-se a um agitador orbital, a 90 rpm, 37° C, em ambiente fechado e controlado. O motivo pelo qual não se utilizou este agitador na primeira experiência foi devido ao facto de sua interrupção de funcionamento, para recolha de alíquota ou adição de fluido, demorar mais de 15 segundos a retomar a operação. Sendo os tempos de recolha tão próximos, particularmente na fase salivar, tal impediria a correta agitação da solução e dificultaria a manutenção da temperatura adequada dentro do agitador orbital. Outra modificação importante foi a recolha de uma alíquota apenas, no final de cada fase digestiva, com um volume de 1 mL, sendo colocada em gelo de imediato e congelada a -80° C tão rápido quanto possível. Consideramos que o facto de este ser um volume filtrável permitiu caracterizar e quantificar de forma adequada os compostos em estudo. Apresentam-se os resultados obtidos para cada composto nos gráficos da figura 40. Na figura 41 mostra-se a sobreposição dos gráficos obtidos para facilitar a comparação dos dados.



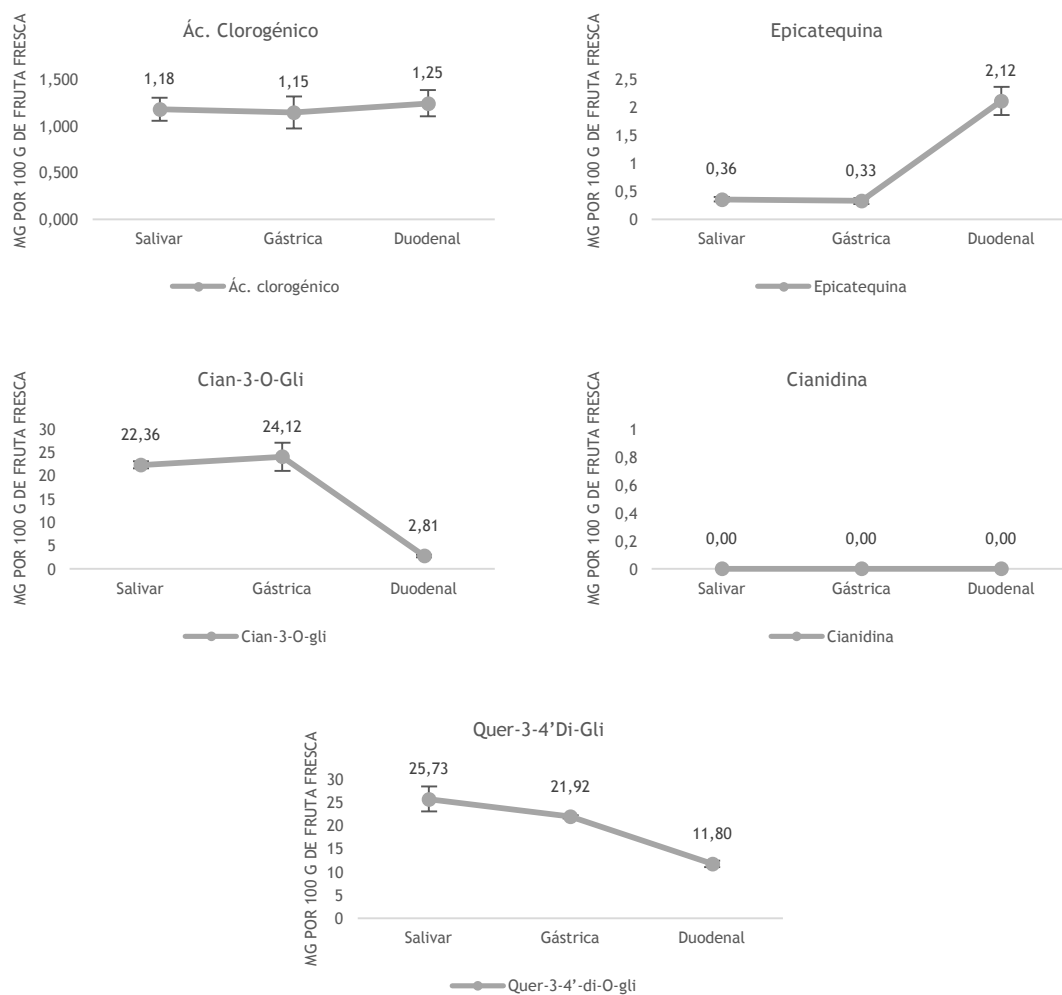


Figura 40: gráficos correspondentes à quantificação *versus* tempo de cada um dos compostos em estudo, barra vertical indicativa do desvio padrão. Todas as quantificações encontram-se expressas em miligramas por 100 gramas de fruta fresca.

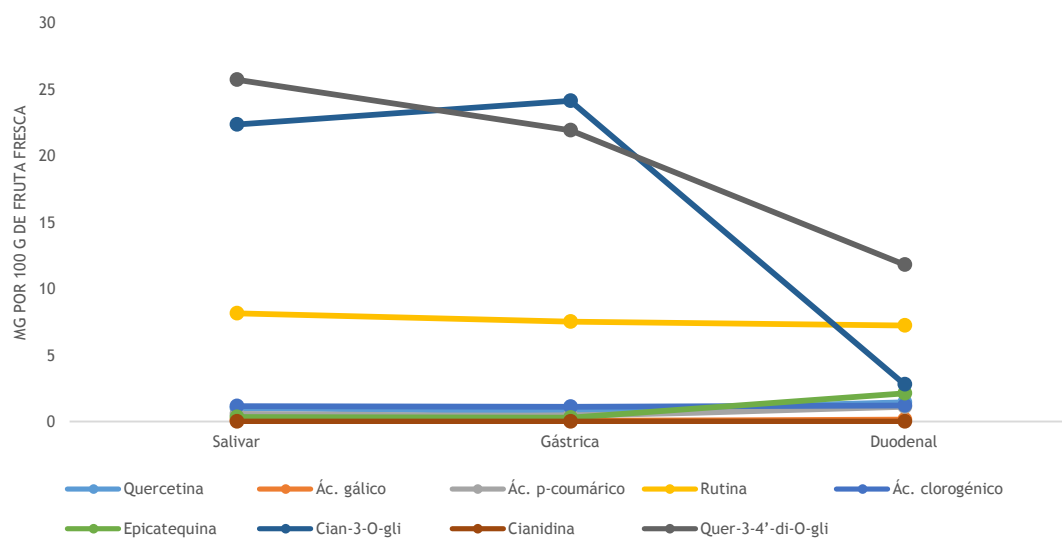


Figura 41: comparação entre os diversos compostos; desvio padrão e etiqueta de dados omitida para simplificação.

Para uma parte destes compostos, nomeadamente para a quercetina, ácido gálico ou ácido p-coumárico verifica-se um aumento durante o procedimento. É possível que estes sejam libertados de outros compostos eventualmente degradados durante a digestão. No caso da epicatequina a quantidade aumenta cerca de seis vezes entre a primeira e a última fase digestiva.

Outros compostos, porém, diminuem durante o processo digestivo, nomeadamente a rutina e particularmente a cianidina-3-O-glicosídeo e a quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo, sendo a degradação durante o processo digestivo evidente e expectável, já que a ligação entre o glicosídeo e o composto é quimicamente mais instável. Por outro lado, seria possível uma degradação destes compostos em cianidina e quercetina. Para o primeiro não é possível retirar conclusões já que as concentrações obtidas se encontram por baixo do valor de LLOQ estabelecido, pelo que o método não é válido para a sua quantificação. Relativamente à quercetina, regista-se um aumento da concentração desta, não sendo proporcional à diminuição de rutina e quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo, sendo este último o composto com maior quantidade. A rutina, sendo um rutinósido da quercetina, também diminui durante o procedimento, provavelmente devido ao mesmo motivo. O aumento da quantidade de quercetina pode também derivar deste composto. A epicatequina, não tendo sido quantificada na “Experiência 1”, demonstra agora um aumento considerável durante a fase intestinal, resultando provavelmente da degradação dum outro composto.

Os resultados obtidos nesta segunda experiência, com as alterações referidas face ao primeiro conjunto de ensaios, mostraram-se precisos, tendo em conta a análise do desvio padrão e respetivo coeficiente de variação, mantido sempre abaixo de 15%. Como referido, a evolução concentração/tempo durante cada uma das fases digestivas é praticamente depreciável, motivo pelo qual se pôde realizar uma quantificação apenas no final de cada momento digestivo. Apesar de considerar que os resultados da “Experiência 2” são mais precisos e fiáveis, verifica-se que são concordantes com os obtidos na “Experiência 1”, motivo pelo qual os últimos foram incluídos neste trabalho. A realização desta primeira experiência permitiu demonstrar que a variação temporal da quantidade calculada dentro duma dada fase digestiva é praticamente desprezável, pelo que se pôde realizar a “Experiência 2”, com as condições descritas.

Relativamente à bibliografia existente foi encontrado apenas um trabalho envolvendo um processo digestivo simulado para previsão da biodisponibilidade do fruto de *Prunus avium* L., por M. Fazzari *et al.* (66) recorrendo a uma modificação do trabalho de Gil-Izquierdo *et al.* (49). Os autores do trabalho, através de membranas dialisáveis, métodos fotocolorimétricos e HPLC-DAD, avaliaram a diferença de compostos entre os dois lados da membrana. No entanto, o objetivo do trabalho não pretendia quantificar a evolução das concentrações durante o

processo digestivo, motivo pelo que não foi possível realizar comparações e retirar conclusões.

#### 4. Conclusões e Perspetivas Futuras

A realização deste trabalho permitiu desenvolver um método analítico baseado na cromatografia líquida acoplada a um detetor de fotodiodos para a identificação e quantificação de compostos fenólicos em amostras de cereja. O método desenvolvido apresentou linearidade no intervalo de concentrações de 2-5 µg/mL com um R<sup>2</sup> superior a 0,99 para todos os compostos, sendo o limite de quantificação de 2 µg/mL. Tendo em conta os critérios de aceitação das normas de validação utilizadas, este método mostrou ser seletivo, sensível, exato e preciso, uma vez que todos os parâmetros estudados se encontravam dentro dos valores estabelecidos.

Um modelo digestivo simulado permitiu auxiliar a caracterização do que sucede aos compostos fenólicos quando sujeitos às agressivas condições do processo digestivo. Verifica-se que, de forma geral, o teor de compostos fenólicos mantém-se inalterado durante o processo digestivo, com exceção dos glicosídeos que sofrem significativa degradação durante este processo. Inferimos que estes compostos são resistentes a este processo e considera-se que ficam então disponíveis para absorção.

Apesar de a bioacessibilidade ser frequentemente esquecida, particularmente no ramo das ciências farmacêuticas, em detrimento da biodisponibilidade, este conceito tem um enorme relevo em estudos focados na nutrição. A sua caracterização permite compreender qual a real quantidade disponível para ser absorvida.

Foi possível, ainda, caracterizar seis variedades diferentes de cereja, todas oriundas da região do Fundão: *Saco*, colheita de 2015 e 2017, *Primulat*, *Summit*, *Brooks*, *Earlise* e *Sweetheart*. Com base nos resultados obtidos, podemos afirmar que a variedade *Primulat* apresenta a maior quantidade de compostos fenólicos no geral, e a variedade *Earlise* a menor. Embora esta comparação não fosse o escopo inicial deste trabalho, acreditamos que a sua adição veio enriquecer o conhecimento existente sobre o fruto de *Prunus avium L.* e sobre a cereja do Fundão em particular, reconhecida pela sua elevadíssima qualidade e valor de mercado.

Por outro lado, foi também possível, para a variedade *Saco*, caracterizar e comparar o extrato obtido de duas colheitas diferentes, 2015 e 2017, concluindo-se que, de forma geral, o teor de compostos fenólicos é similar. Importante exceção apenas para a cianidina-3-O-glicosídeo, exibindo muito menor quantidade na colheita de 2015. No entanto, uma possível explicação para o achado pode residir na labilidade das antocianinas com uma elevada sensibilidade química, enzimática e ambiental. Estes compostos, glicosilados, degradam-se

acima de 37° C, e erros na extração ou conservação podem prejudicar grandemente a quantidade de antocianidinas, como a cianina, ou antocianinas como a cianidina-3-O-glicosídeo.

Num momento em que a preocupação com a alimentação atinge níveis sem precedentes, nomeadamente com o consumo de antioxidantes e frutos ricos nestes compostos, este tipo de estudos assume uma particular relevância e interesse. A cereja do Fundão assume um papel de destaque no mercado nacional e internacional, e os estudos que se têm vindo a realizar são provas científicas disso mesmo. Este estudo deverá ser continuado com uma avaliação *in vitro* da biodisponibilidade dos compostos que agora se provou serem bioacessíveis, e portanto, disponíveis para absorção. Como tal é sugerido a continuação deste estudo a nível celular, nomeadamente com o uso de células Caco-2. Por outro lado, uma comparação sistemática anual entre as diversas variedades duma mesma colheita, através da aplicação anual da metodologia aqui descrita, poderá constituir um trabalho interessante a médio prazo, nomeadamente através do estudo causal entre as condições meteorológicas e ambientais de um determinado ano e as quantificações obtidas a nível de compostos fenólicos, permitindo compreender a influência do ambiente neste importante conjunto de compostos.



# Capítulo 2 - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

## 1. Introdução

Para a conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, na Universidade da Beira Interior, é pedido ao aluno a preparação duma dissertação que deverá conter um relatório dos estágios realizados e uma monografia propriamente dita. Neste Capítulo encontra-se um resumo da larga experiência adquirida na Farmácia Moderna, muito mais abrangente do que quaisquer palavras possam mostrar, e que se realizou de 23 de janeiro de 2017 a 7 de abril de 2017. Tentou utilizar-se uma estrutura lógica, com um encadeamento e ordem sequencial e que reflete de facto a experiência obtida.

Assim, o presente relatório começa com uma muito importante contextualização física da Farmácia Moderna, e da localidade onde se encontra inserida, a Vila do Tortosendo. É descrito o espaço, os meios (materiais e humanos) e outros aspetos importantes. De seguida é descrito o medicamento, pedra basilar da Prática Farmacêutica, com uma série de definições e sistemas de classificação adequados. Posteriormente entra-se no segmento relacionado com o “Circuito do Medicamento”, descrevendo-se os processos relacionados com a entrada e saída de medicamentos, culminando, naturalmente, com a dispensa de medicação e todas as considerações relativas à mesma. Foi assumida uma posição crítica construtiva, não relativa à farmácia onde foi realizado o Estágio, mas sim ao atual sistema e legislação de dispensa de medicação e seus trâmites. Os pontos seguintes deste relatório remetem para outros cuidados de saúde prestados na FM, serviços disponíveis, preparação de manipulados, outrora considerados como Prática Farmacêutica de excelência e hoje praticamente em desuso, e por fim aspetos relacionados com a gestão e contabilidade.

Os aspetos são narrados de forma impessoal, sem que isso comprometa a autenticidade da experiência vivida e apenas por uma questão de uniformidade em toda a dissertação. Quando possível, foi tentado categorizar e descrever as situações rotineiras, evitando cair em explicações passo a passo desnecessariamente eruditas. Foram incluídos alguns exemplos, sempre que possível.

A farmácia é, sempre foi, e deverá continuar a ser, um centro de promoção, manutenção e recuperação de Saúde de excelência. É muitas vezes o primeiro e o último local onde o utente se dirige em caso de doença. O papel transversal da farmácia é impar em comparação com qualquer outro estabelecimento de saúde. A figura do Farmacêutico como profissional máximo da farmácia, é por este motivo merecedora do maior respeito, seja pelo grau de

exigência que lhe é pedido ou pela responsabilidade inerente ao cargo, que muitos tentaram diminuir ao longo dos anos. É dever dos alunos, dos profissionais, dos Professores (fundamentais para a qualidade dos nossos Farmacêuticos), das Associações de Estudantes e do legislador lutar para que esta nobre Profissão tenha o respeito e a dignidade que merece, combatendo as dificuldades pelas quais as farmácias atravessam.

## **2. Caracterização e Contextualização da Farmácia Moderna**

### **2.1. A Vila de Tortosendo - Localidade Pós-industrial**

Para uma melhor compreensão dos processos e realidades deparadas durante o estágio, é fundamental conhecer a localidade onde se encontra a Farmácia Moderna.

A vila do Tortosendo, elevada a essa condição em 1927, celebra no corrente ano de 2017 o seu 90º aniversário, coincidindo esta data com o aniversário da instalação da rede elétrica. Podendo passar por qualquer outra localidade limítrofe a um centro urbano de maior dimensão e poderio económico - a Covilhã - o Tortosendo assumiu no último século um papel vital e de extraordinária importância para a economia local.

Apesar de ser uma vila jovem, em função de possuir residentes que optaram por aqui fixar residência em função da proximidade dos centros urbanos, a verdade é que, a par com o resto do interior, a população idosa tem vindo a aumentar consideravelmente, sendo difícil atualmente para os lares da região dar resposta ao crescente número de pedidos. Centrada numa localização nobre, precisamente no centro desta Vila, como descrito abaixo, a Farmácia Moderna impõe-se com uma farmácia com um portefólio de utentes bem estabelecido, verificando-se que a esmagadora maioria dos atendimentos e dispensas são realizadas a utentes registados e assíduos desta farmácia.

O apogeu do século passado relativo à indústria dos lanifícios leva a que hoje o Tortosendo seja uma vila com uma elevada percentagem de idosos que usufruem do Fundo Especial de Segurança Social para o Pessoal dos Lanifícios. Este facto tem uma efetiva repercussão no quotidiano da farmácia. Infelizmente, por força de pensões baixas e algum desemprego, os Farmacêuticos na FM têm de possuir algum tato para as questões sociais inerentes. Esta sensibilidade estende-se à atribuição de crédito aos utentes conhecidos da FM, ajudando a garantir que nenhum utente fica sem a medicação necessária. Assim, decorrente deste contexto, verifica-se uma distribuição heterogénea no fluxo de utentes ao longo mês, com picos no início do mês e em particular a partir do dia 10, dia em que são entregues as reformas da Segurança Social.

Este contexto socioeconómico e cultural acaba por definir o tipo de dispensas e de utentes que frequentam a FM, sendo o dia-a-dia nesta farmácia previsivelmente diferente do que será

uma farmácia num centro comercial, num local de passagem ou ainda próximo de um hospital. É uma farmácia verdadeiramente moderna, e que preserva a proximidade do atendimento ao utente que remanesce das velhas farmácias do século passado, de que também a Farmácia Moderna, com os seus 80 anos de história, é um grande exemplo.

## 2.2. A Farmácia Moderna - História e Espaço Físico

A Farmácia Moderna é uma farmácia localizada no coração da Vila de Tortosendo, justamente na sua praça mais emblemática - a Praça da Liberdade. Foi fundada em 1936 e nos largos anos de vida que já conta foi sendo atualizada e renovada para se tornar no espaço cómodo, acolhedor, profissional e contemporâneo que hoje é.

A FM foi renovada em 2012, passando dum espaço mais pequeno, fechado e ladeado por balcões para um espaço dentro do conceito de *open space*, tendo atualmente 3 balcões de atendimento na sala destinada aos utentes com uma área de 43 m<sup>2</sup>, onde os artigos de saúde, dermocosmética, capilares, puericultura, podologia e sexualidade estão expostos por secções ordenadas e bem estabelecidas. Dentro duma mesma secção os artigos encontram-se ordenados por marcas e/ou linhas comerciais, de forma arrumada e limpa.

Imediatamente atrás dos postos de atendimento, localizados de frente para a porta de entrada, encontra-se uma variedade de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica e também um conjunto apreciável de suplementos alimentares. Os produtos encontram-se maioritariamente arrumados de acordo com a patologia/sintomatologia a que se destinam, e dentro duma mesma prateleira os produtos encontram-se ordenados de forma a melhor gerir o stock dos mesmos, nomeadamente recorrendo ao princípio “First In, First Out”. Na sala de atendimento encontra-se, ao centro, uma gôndola onde se localizam produtos de interesse sazonal, dependendo da estação do ano, celebração ou promoção ocasional. A título de exemplo, durante a época natalícia podemos encontrar *packs* de perfume, cremes ou outros produtos, enquanto que no final de janeiro, em função da época de exames escolares, posicionam-se suplementos destinados a estudantes e à fadiga mental. Ainda é possível encontrar um aparelho de medição de pressão arterial, peso e altura. Existem algumas cadeiras para conforto dos utentes e uma pequena mesa encostada onde se encontra alguma literatura infopublicitária disponível para os utentes e algumas cópias da revista Saúda, da Associação Nacional das Farmácias.

Diretamente adjacente à Sala de Atendimento ao Público encontra-se o Gabinete de Atendimento Personalizado, onde se encontra o equipamento de medição de colesterol, triglicéridos, glicémia, o dispositivo de medição da pressão arterial e uma balança de composição corporal. Existe material disponível para prestação de cuidados de primeiros socorros e o material de suporte básico de vida que a legislação obriga a ter disponível na

farmácia, em função da administração de injetáveis, outro dos serviços farmacêuticos oferecidos pela FM, descrito adiante. Encontra-se uma pequena mesa e duas cadeiras e um cadeirão reclinável de utilização múltipla. É neste espaço, também, onde se pode efetuar um atendimento privado, nomeadamente caso o utente peça para mostrar algum sinal visível para obter Aconselhamento Farmacêutico.

Imediatamente à direita dos balcões, fora da área acessível ao público, existe um corredor, ladeado por sistemas de arrumação manual de medicação, em gavetas, onde de um lado se encontram organizados os medicamentos genéricos, por ordem alfabética de princípio ativo, alguns dos medicamentos para utilização exclusiva na diabetes, as pomadas medicamentosas e algum stock diverso. No lado oposto estão patentes os medicamentos de marca, seguindo a mesma lógica de arrumação e também soluções, suspensões, ampolas e pós. Dentro de cada gaveta segue-se a ordem alfabética. Por norma, para um determinado medicamento, as dosagens encontram-se juntas, sendo necessária alguma atenção por parte do Farmacêutico ou Técnico que está a efetuar a dispensa. Noutros casos, particularmente quando existe uma semelhança considerável entre as dosagens ou número de unidades dum mesmo medicamento, estas podem encontrar-se separadas. Um caso notável é do medicamento Egostar®, disponível com 3 comprimidos ou apenas 1. As embalagens têm dimensão e características idênticas, excetuando, naturalmente, a indicação da quantidade.

No fundo da área de arrumação da medicação está a zona de receção de encomendas, que conta com uma bancada, gavetas de arrumação de receituário, arquivos de faturação e equipamento informático. Este espaço tem uma área de 19m<sup>2</sup>. É nesta zona que se processam as receções, gestão de devoluções, regularização de devoluções, controlo e monitorização de validades e conferência de receituário. Encontra-se também uma câmara frigorífica, onde se armazenam os produtos que dependem de refrigeração.

Anexo a esta área está o laboratório de preparação de manipulados, o gabinete de gestão e contabilidade, com 6 m<sup>2</sup> e a casa de banho, com aproximadamente 3 m<sup>2</sup>.

No laboratório de preparação de manipulados, com uma área de 2 m<sup>2</sup>, encontram-se os excipientes e reagentes necessários para as diversas necessidades, nomeadamente a preparação extemporânea de suspensões, pomadas ou soluções conforme requerido pelo utente ou médico prescriptor. De acordo com a lei vigente é necessário ter disponível em permanência material e matéria prima adequadas. Este tópico será discutido posteriormente.

No escritório encontram-se registos de faturação e diversos equipamentos. Nesta área é onde se realizam as encomendas diárias aos fornecedores da FM. É aqui também que o Sr. José Manuel Campos, gerente e contabilista certificado da farmácia, lida com todos os assuntos inerentes à sua formação financeira e contabilística.

### 2.3. Recursos Humanos, Equipamentos, Suporte Informático e Material Científico Disponível na Farmácia Moderna

A Farmácia Moderna conta atualmente com sete colaboradores. A Dra. Maria Octávia Monteiro Vaz, Diretora Técnica da mesma desde 1961, O Dr. Fernando Campos, Farmacêutico Adjunto Substituto, a Dra. Andreia Abrantes, a Dra. Vânia Neves, Farmacêuticas Adjuntas, o Sr. João Alves, Técnico de Farmácia, o Sr. José Manuel Campos, contabilista certificado, e a D. Altina, responsável pela limpeza. A equipa goza duma relação interpessoal estupenda e o ambiente na farmácia é calmo e descontraído. Todos os colaboradores estão devidamente identificados com cartões onde consta o nome e o cargo do mesmo. Naturalmente são tidas em conta as diferentes funções e responsabilidade de cada um, conforme estabelecido no manual “Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária”(86).

Relativamente aos deveres do Diretor Técnico, a legislação portuguesa, no Decreto-Lei 307/2007, artigo 21º prevê que este deverá, entre outros aspetos, assumir a responsabilidade pelos atos farmacêuticos praticados na farmácia, promover um uso racional da medicação dispensada, garantir as condições de fornecimento de medicação e as próprias condições da farmácia, zelar pelo cumprimento dos princípios e normas deontológicas afetas à Profissão Farmacêutica e assegurar o respeito pela legislação em vigor. Na Farmácia Moderna, todos os colaboradores têm presentes os deveres e responsabilidade para com os utentes (87).

A FM utiliza como sistema integrado de gestão o *software* concebido pela Associação Nacional das Farmácias e pela Glintt, o SIFARMA 2000, que é utilizado pela esmagadora maioria das farmácias a nível nacional. Com este *software*, o Farmacêutico tem a seu abasto um registo continuo das vendas anteriores realizadas a determinado utente, registo das medições relacionadas com o mesmo e dados relativos ao seguimento farmacoterapêutico. Este sistema consegue, de forma integrada e numa única aplicação, gerir as encomendas, stocks, validades, entradas, vendas e devoluções. Disponibiliza informação científica atualizada e completa sobre cada um dos medicamentos existentes, a posologia, composição, efeitos adversos, precauções, excipientes, e outros dados relevantes ao aconselhamento farmacêutico.

O *software* SIFARMA 2000 permite a criação de contas de utilizador individuais, permitindo associar as vendas e demais ações a um utilizador concreto. Também é possível limitar a ação de cada um de estes a determinadas operações e registos. Este programa consegue de forma integrada fazer o balanço de caixa e controlar o caixeiro automático que a FM dispõe, um aparelho que recebe e guarda o numerário e faz o troco de forma simples e automatizada.

A nível de gestão, o *software* fornece informação crucial de vendas, compras, stocks, validades, preços e outros. Tal constitui uma ferramenta valiosa aquando da hora da

realização das encomendas e reposição de stocks. O sistema é interligado com os principais fornecedores disponíveis em Portugal, o que permite que as compras sejam feitas de forma automática sem sequer sair do balcão de atendimento. No entanto este aspeto será explicitado adiante, no ponto “Entrada no Circuito do Medicamento na Farmácia Moderna”.

Como pedido na legislação, DL nº 307/007, alterado pelo DL nº 171/2012, Deliberação 41/CD/2009, qualquer farmácia comunitária deve ter disponível fontes científicas estabelecidas no momento da dispensa de medicamentos, em particular a Farmacopeia Portuguesa, IX Edição, em formato papel, online, ou eletrónico, desde que proveniente de *website* reconhecido pelo INFARMED. Na FM, encontra-se também alguma bibliografia recomendada, nomeadamente o “Formulário Galénico Nacional”, Formulário Galénico Português”, “Manual de Medicamentos Não Prescritos”, “Direito Farmacêutico”, “Index Merck”, “Dicionário de Termos Médicos”, “Índice Nacional Terapêutico” entre outros manuais relevantes. O “Manual de Boas Práticas”, editado pela Ordem dos Farmacêuticos refere ainda o Prontuário Terapêutico e o Resumo das Características do Medicamento como fontes obrigatórias de informação na dispensa. A FM tem ainda presente, em local próprio e identificado, um Livro de Reclamações, como previsto no DL 307/2007, alterado pelo DL nº171/2012; DL nº 156/2005 e pela Portaria nº 896/2008 (87-90).

O Farmacêutico tem o dever de manter-se atualizado. A Prática Farmacêutica implica um estudo e dedicação contínuos, não apenas pela responsabilidade inerente no aconselhamento e contacto com o utente, mas também pela complexidade intrínseca ao medicamento e à constante atualização do prontuário e aparecimento de novas substâncias.

Encontram-se também algumas fontes de carácter periódico, como a “Revista da Ordem dos Farmacêuticos”, a revista “Saúda” da ANF, a “Farmacêutico News” e a “Farmácia Distribuição”.

### **3. Medicamentos e demais Produtos de Saúde**

#### **3.1. Definições e Nomenclaturas**

Para um adequado exercício da Profissão, e embora este aspeto seja frequentemente ignorado pelos utentes, uma adequada utilização da nomenclatura e definições existentes é crucial para a redução de erros na dispensa e na prestação de um serviço exímio, coerente, responsável e competente à população.

O Decreto Lei nº 176/2006 inclui, no artigo 3º, um conjunto de definições fundamentais para o Profissional de Farmácia. Nesse sentido consideramos relevante, como mínimo, incluir no presente relatório as seguintes definições, adaptadas, para facilitar a leitura e compreensão (91).

Considera-se “acondicionamento primário” o envase que se encontra em direto contacto com o medicamento, nomeadamente o blister ou frasco. “Acondicionamento secundário” define a “embalagem exterior onde o acondicionamento primário é colocado”. “Denominação comum” é a designação comum internacional adotada pela Organização Mundial de Saúde para as substâncias ativas presentes em medicamentos. Esta “não pode ser objeto de registo de marca ou nome”. Conhecemos “distribuição por grosso” como a atividade de fornecimento de medicamentos a farmácias, serviços médicos e outras unidades de saúde, excluindo o serviço ao público geral.

A “dosagem” refere-se ao “teor de substância ativa”, ou seja, a quantidade de substância ativa em cada “unidade de administração” ou por unidade de volume ou peso, dependendo da “forma farmacêutica”, que se define como o estado final que as substâncias ativas apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas adequadas. A maioria das “formas farmacêuticas” compreende a mistura entre substância ativa e excipiente, que no referido diploma consta como “qualquer componente do medicamento, que não a substância ativa e o material da embalagem”.

É considerada “medicamento” a “substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças”, passível de administração a seres humanos e que possa ter uma utilização no diagnóstico médico e que exercendo “ação farmacológica, imunológica ou metabólica” restaura, corrija ou modifique funções fisiológicas. O mesmo conceito é aplicado a “medicamentos à base de plantas”, quando as substâncias ativas do mesmo sejam exclusivamente derivadas de plantas. O “medicamento genérico” é o medicamento com a “mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência tenha sido demonstrada”.

A “substância ativa” é a porção farmacológica do medicamento, que “quando utilizada no seu fabrico, se torna um princípio ativo desse medicamento, destinado a exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica com vista a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas ou a estabelecer um diagnóstico médico”.

### 3.2. Sistemas de Classificação Utilizados em Farmácia Comunitária

No que diz respeito à forma como os medicamentos são arrumados na Farmácia Moderna, esta já foi descrita em ponto anterior. No entanto, a classificação não se limita a este aspeto. Os medicamentos, e em particular as substâncias ativas, são passíveis de se categorizar, de forma a facilitar o seu estudo, conhecimento, procura, ou, naturalmente, arrumação.

### 3.2.1. Classificação Farmacoterapêutica

No prontuário terapêutico *online*, do INFARMED, é possível encontrar os princípios ativos agrupados por sistema ou grupo patológico a que se destinam, por exemplo “aparelho cardiovascular” ou “medicamentos usados em afeções cutâneas”. Este sistema de classificação pode ser considerado demasiado simplista, na medida em que uma grande quantidade de fármacos possui várias utilizações e pode por esse motivo ser encontrado em várias categorias, dependendo inclusive da forma farmacêutica em que é utilizado. Ainda assim, é provavelmente a forma mais lógica de coordenar o ensino dos mesmos, permitindo uma associação concreta entre fármaco e patologia. Este sistema é conhecido por classificação farmacoterapêutica e é baseado, de forma simplificada, no sistema de classificação ATC (*Anatomical Therapeutical Chemical*).

### 3.2.2. Sistema de Classificação ATC (*Anatomical Therapeutical Chemical*)

Este sistema de classificação funciona de forma estruturada e extremamente bem categorizada. A cada medicamento corresponde apenas um código ATC. Se uma substância ativa existir em mais de uma dosagem ou via de administração pode ter mesmo códigos diferentes.

No sistema de classificação ATC há uma divisão basilar, similar à classificação farmacoterapêutica, de acordo com o órgão ou sistema onde se pretende que o medicamento atue. Depois o fármaco é subdividido, num total de 5 níveis, sendo que cada nível é identificado com um número ou letra. O 1º nível corresponde então aos 14 grupos principais, grupos anatómicos, sendo o 2º nível referente ao subgrupo terapêutico, e o 3º é complementar deste, correspondendo ao subgrupo farmacológico, informando sobre o mecanismo de ação de forma muito geral. O 4º nível remete para a estrutura química do grupo de fármacos e o último nível completa a classificação, correspondendo à substância química.

A título de exemplo deixamos a classificação ATC do lisinopril:

C - Sistema Cardiovascular

C09 - Agentes ativos no sistema renina angiotensina

C09A - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina

C09AA - Inibidores da enzima de conversão da angiotensina

C09AA03 - Lisinopril

## 4. Entrada no Circuito do Medicamento na Farmácia Moderna

### 4.1. Realização de Encomendas

A esmagadora maioria das encomendas é realizada de forma integrada pelo programa SIFARMA, requerendo apenas a aprovação do gestor da farmácia, com base nos valores definidos como stock máximo e mínimo no próprio programa. A partir do momento da realização da encomenda, esta segue os canais habituais, sendo entregue em horários pré-acordados com a Farmácia Moderna. Verifica-se que a FM trabalha maioritariamente com dois distribuidores grossistas. De um destes, por usufruir de elevada proximidade geográfica, recebe mesmo encomendas 4 vezes por dia, de manhã, depois do almoço, meio da tarde e fim da tarde. Com o outro principal fornecedor recebe apenas encomendas de manhã e depois do almoço. Numa base diária recebem-se encomendas de outros fornecedores, nomeadamente diretamente de laboratórios, dermocosmética e outro tipo de acessórios. Conseguimos distinguir vários tipos de encomendas, conforme a situação em que nos encontramos.

#### a) Encomenda diária;

Corresponde à encomenda realizada, geralmente, no final da manhã e no final do dia com o intuito de restabelecer os stocks dos medicamentos dispensados ao longo do dia.

#### b) Encomenda instantânea;

É a encomenda passível de ser realizada pelo operador diretamente no balcão de atendimento, sendo mesmo possível indicar ao utente a disponibilidade e a data e hora previstas de chegada. A comunicação entre o SIFARMA 2000 e os distribuidores é feita *online*, sem que seja necessário contacto humano ou qualquer tipo de confirmação. Através deste meio é possível encomendar qualquer quantidade que seja necessária. A encomenda será depois entregue pelo circuito normal de distribuição.

#### c) Encomenda Via Verde;

Para determinados tipos de produtos, nomeadamente aqueles que estão sob elevada pressão do mercado, com elevada rotatividade, e que cumulativamente sejam muito importantes para a manutenção da saúde do utente, existe um canal específico de encomenda, a encomenda Via Verde, que permite racionalizar o gasto de medicamentos e garante a distribuição dos mesmos a todas as farmácias que os necessitem de forma a nenhum utente ficar sem o mesmo. A encomenda está limitada a 2 unidades de cada vez e tem de estar obrigatoriamente associada a uma receita médica. A entrega é depois realizada pelos canais normais. Um exemplo dum medicamento sujeito a este mecanismo de controlo é o Lovenox® 80 mg/0,8mL, injetável subcutâneo (enoxaparina sódica) (92).

d) Encomenda manual;

Se determinada encomenda for feita diretamente através do telefone, o que pode acontecer quando tentamos encontrar um produto menos frequente ou que não tenha código ANF, então não ficará diretamente registada através do SIFARMA 2000. Aquando da receção esta encomenda terá um código interno diferente e terá de ser criada manualmente antes de se proceder à sua receção, de forma manual, como será descrito adiante.

## 4.2. Receção de Encomendas

Independentemente do tipo de encomenda que foi realizada, a receção da mesma é sempre feita na área já descrita para o efeito. Uma das gavetas do armário inferior à bancada de trabalho tem uma especial função de suporte onde se coloca a caixa que se está a rececionar. Em primeiro lugar, é necessário reconhecer o tipo de entrada que se está a realizar. Geralmente as encomendas são feitas diretamente pelo SIFARMA, e nesse caso é atribuído um número interno que é enviado ao fornecedor e que consta na fatura. Assim basta encontrar o número interno e rececionar a encomenda em questão. Para cada receção é necessário deixar o número de guia de transporte, a data e a hora. É fundamental verificar a existência de produtos de frio, que devem ser armazenados de imediato na câmara frigorífica existente na área. De seguida introduzem-se os produtos presentes na caixa, atentando sempre a uma série de aspetos, nomeadamente o estado geral do acondicionamento secundário, a quantidade de embalagens, o prazo de validade e o preço impresso na cartonagem. De seguida os produtos são deixados no balcão de forma ordenada, juntando os artigos idênticos para facilitar a posterior arrumação. A receção termina com a verificação do preço faturado e verificação do preço de venda ao público (nos produtos marcados *in situ*). O total líquido faturado tem de ser idêntico ao indicado pelo programa, garantindo assim que os preços introduzidos estão corretos. De seguida termina-se a receção, transferindo os artigos não entregues para outro fornecedor, de forma a poderem ser incluídos pelo gestor da farmácia na próxima encomenda diária. Posteriormente, procede-se à impressão das etiquetas, que devem ser colocadas em todos os medicamentos não sujeitos a receita médica e todos os restantes produtos de saúde, acessórios e demais que não medicamentos sujeitos a receita médica. O programa questiona ainda se o utilizador pretende enviar a informação relativa aos medicamentos em falta para o INFARMED. O envio desta informação oferece ao referido instituto uma perceção real das faltas de medicamentos a nível nacional. Por fim pede-se um número de registo de receção de benzodiazepinas e psicotrópicos/estupefacientes, quando os há, e é automaticamente utilizado o número de fatura da encomenda.

Para as encomendas que não sejam instantâneas ou diárias há, no entanto, algumas nuances de realce. Para a encomenda Via Verde, por exemplo, além da diferença na quantidade passível de ser encomendada, verifica-se ainda que depois da receção propriamente dita é necessária uma segunda confirmação da quantidade recebida em comparação com a

quantidade encomendada. Esta informação é depois armazenada internamente. Para as encomendas manuais, realizadas por telefone ou outros meios de comunicação, não sendo realizadas pelo SIFARMA, não têm, como referido, um número interno. Por esse motivo não ficam disponíveis para imediata receção. Nestes casos, é necessário aceder a “gestão de encomendas” a partir do menu principal da aplicação e de seguida criar uma nova encomenda manual, onde se insere o fornecedor, hora e data de entrega. A partir daqui introduzem-se os elementos recebidos, podendo passar os mesmos de imediato como se faria numa receção normal, ou em alternativa introduzir os códigos de forma individual. Posteriormente aprova-se a encomenda manual e de seguida clicando em “enviar” somos confrontados com a opção entre enviar para o “fornecedor” ou enviar “para papel”. Para este tipo de encomendas seleccionamos a segunda opção. Assim a encomenda já estará disponível no menu de receção. Aqui já só será necessário proceder como indicado para as encomendas ditas “normais”.

### 4.3. Armazenamento e Organização

A partir do momento em que os artigos estão dispostos na bancada de trabalho, da forma mais organizada possível, podemos iniciar o processo de arrumação e organização dos mesmos de forma a poderem ser encontrados da maneira mais rápida possível, facilitando o atendimento. Este é, por isso, um momento de extrema importância. A arrumação realiza-se da forma já descrita anteriormente, separando medicamentos de marca de genéricos e separando por forma farmacêutica, nomeadamente colocando em gavetas próprias as soluções, pós, ampolas e pomadas. Na arrumação segue-se o princípio “*first in, first out*”, para reduzir a possibilidade de os produtos perderem a validade. São ainda arrumados de forma a maximizar o espaço e ainda garantindo que são visíveis a qualquer colaborador da farmácia. Nas gavetas superiores, que têm uma base em grelha para se poder observar de baixo, naturalmente o princípio inverte-se devendo o nome do produto ficar virado nesta mesma direção.

### 4.4. Controlo de Prazo de Validade

O controlo dos prazos de validade é um aspeto importante, sendo necessário para assegurar uma boa gestão da farmácia e também como forma de garantir uma dispensa responsável, reduzindo os erros e a possibilidade de um utente consumir um produto fora de validade, com as potenciais implicações legais e de saúde que isso implicaria. Assim sendo, de forma mensal, é impressa uma listagem por grupo de produtos, disponível através do menu principal do SIFARMA, clicando em “produtos”, “prazos de validade” e “listagem de controlo”. Esta listagem é realizada tendo em vista os produtos que expiram até aos dois meses seguintes à data da criação da mesma, sendo que os critérios utilizados são completamente personalizáveis. Conseguem-se seleccionar apenas o tipo de produtos do nosso interesse, nomeadamente medicamentos sujeitos a receita médica, suplementos alimentares, entre

outros, bem como o mês e ano em que expiram. Depois cada um dos produtos deve ser procurado individualmente, para conferir o prazo de validade do mesmo e o stock existente. Os dados encontrados são depois introduzidos de volta no SIFARMA, através do mesmo menu, clicando em “correção de validades”.

#### 4.5. Devoluções a Fornecedores

As devoluções aos fornecedores podem ser realizadas por uma miríade de motivos. Produtos próximo do final da validade são devolvidos, com o intuito de serem trocados ou ser obtida uma nota de crédito. Mesmo linhas de acessórios, dispositivos médicos e outros produtos de saúde, incluindo dermocosmética, possuem um prazo de validade. Outros motivos incluem pedidos duplicados, erros de stock mínimo e máximo no SIFARMA, erro de envio pelo fornecedor, produto errado, produto danificado em transporte, entre outros. A gestão das devoluções é realizada a partir do menu principal do SIFARMA. Na barra superior, selecionar “encomendas”, “gestão de devoluções”. Na janela aberta, deve-se criar uma nova devolução, sendo necessário introduzir o fornecedor pretendido e outros dados genéricos. Depois é necessário preencher com os produtos que se pretende devolver. O sistema cria depois uma guia de transporte, em triplicado, sendo necessário carimbar e assinar a mesma. O responsável pelo transporte deve assinar o triplicado que fica na posse da farmácia. Idealmente uma das cópias que é enviada ao fornecedor deveria ser devolvida à farmácia, mas nem sempre isso se verifica.

#### 4.6. Entrega e reciclagem de medicamentos usados - VALORMED

Os resíduos de medicamentos e respetivas embalagens constituem um perigo para a saúde humana quando não são devidamente processados. A sua acumulação no lixo doméstico e potencial perigo para a população levaram a que as farmácias, pela Associação Nacional das Farmácias, a Indústria, pela APIFARMA, e os Distribuidores, cientes do tipo específico de resíduo que é o medicamento, colaborassem de forma sinérgica, nascendo assim a VALORMED em 1999. Trata-se de uma instituição tutelada pelo Ministério do Ambiente que tem como objetivo a triagem, recolha e processamento de todos os resíduos relacionados com medicamentos. A recolha realiza-se a nível da farmácia, onde com a supervisão do Farmacêutico, o utente deposita os restos de medicamentos num contentor adequado para o efeito. Uma vez cheio, pesado e selado, qualquer um dos distribuidores que abastecem a Farmácia Moderna tem a obrigação de levar o contentor VALORMED. Neste momento termina a ligação da farmácia com o sistema. O contentor é depois transportado até um centro de triagem, onde se separam os resíduos, tentando-se reciclar sempre que possível sendo que os resíduos químicos, propriamente ditos, são incinerados.

## 5. Dispensa de Medicamentos

### 5.1. A Receita Médica - Breve Retrospectiva

Os alunos de 2012-2017 foram os primeiros a enfrentar o novo sistema de dispensa inteiramente eletrónica. Num espaço relativamente curto de tempo passámos duma receita inteiramente manual, com as vicissitudes que ainda hoje conhecemos - nomeadamente uma caligrafia difícil, dosagens incompletas ou omissas, frequentes erros de validação - para um sistema inteiramente eletrónico que veio, por um lado, facilitar a vida do Profissional da Farmácia, mas também introduzir novos desafios ao mesmo.

Por esse motivo, uma breve consideração sobre o que é a Receita Médica e a sua evolução ao longo dos últimos anos é devida para compreender as mudanças que o sistema de dispensa enfrentou recentemente. A receita médica começou como um simples papel timbrado, com informação do médico, onde este descrevia a terapêutica recorrendo a linguagem inacessível ao utente. O Farmacêutico, com os seus conhecimentos científicos decifrava a receita e preparava a medicação a dispensar. Com a entrada da farmácia química, as indicações tornaram-se mais simples e o Farmacêutico perdeu uma grande parte da sua ocupação: a farmácia galénica. Posteriormente a receita médica foi alvo dum processo de homogeneização, recorrendo-se a formulários próprios emitidos pelas Autoridades de Saúde e autenticados com vinhetas identificativas do médico e local de prescrição. Mais tarde, nos últimos 5 anos, surgiu a receita eletrónica, já inteiramente dependente de sistemas informáticos, mas que ainda requer o envio de faturas ao Centro de Conferência de Faturas. Apenas no último ano se estabeleceu a receita eletrónica sem papel, facilitando o trabalho do Farmacêutico e reduzindo a possibilidade de erros de dispensa.

A dispensa sem receita médica está prevista na Legislação sob determinadas circunstâncias, nomeadamente se o Farmacêutico considerar urgente a dispensa e se existir registo de tratamento contínuo em doente crónico. Exemplos de medicação dispensada na forma de venda suspensa são medicamentos para doenças respiratórias, para a diabetes, hipertensão ou outro tipo de doenças crónicas cuja continuidade do tratamento não possa ser posta em risco.

A receita manual é hoje uma fração diminuta do total de receitas faturadas, estando permitida a prescrição através desta quando haja falência informática, inadaptação do prescriptor, prescrição no domicílio ou ainda quando não se ultrapassem as 40 receitas por mês.

Uma receita é identificada por um número único, de 19 dígitos. A receita é individual, não sendo permitidas, ou aceites, fotocópias duma receita. Numa receita manual, o número vem já impresso, sendo por isso o formulário único e irrepêtil. Na receita eletrónica, o número

desta é gerado pelo programa de prescrição, a nível do Sistema Central de Prescrições. Em caso de prescrição *offline*, reservado a situações especiais, o sistema cria um número baseado em regras estabelecidas. O número de receita identifica a Região de Saúde, o tipo de receita, o sistema produtor, o centro/entidade que a emite, a sequência, o número de via e ainda um dígito de controle (87,93).

## 5.2. Entidades, Protocolos, Sistemas de Comparticipação e Complementaridade

Antes de 1950 os esquemas de proteção e assistência social não incluíam quaisquer benefícios a nível de medicação. Nesse mesmo ano, porém, é instituída a assistência farmacêutica, complementando a assistência médica já existente. Apenas cobria a população ativa, e era financiada pelas contribuições obrigatórias para as caixas de previdência e apenas visava os produtos de origem nacional, o que na época limitava a sua utilização. A partir desta altura foi-se alargando o leque de medicamentos abrangidos e populações cobertas.

Hoje em dia, a comparticipação é pedida pelo detentor da Autorização de Introdução no Mercado e requer uma avaliação detalhada pelo legislador, tendo em conta o valor terapêutico acrescentado em relação às alternativas existentes e uma eventual vantagem económica.

As comparticipações são reguladas pelo estabelecido no DL nº 48-A/2010, alterado pelo DL nº 106-A/2010 e posteriormente pelo DL nº 103-A/2013, existindo um regime geral de comparticipação e regimes especiais, em função do beneficiário ou de patologias especiais, estando previstos 4 escalões diferenciados de acordo com critérios de essencialidade e de justiça social. Os medicamentos que se destinem a patologias pouco graves ou devido a outras características, não são passíveis de ser comparticipados. Os escalões vão de A a D, correspondendo o “A” a uma comparticipação de 90%, “B” de 69%, “C” de 37% e “D” de 15%. Existem ainda situações particulares, como o Fundo do Pessoal de Lanifícios, que será abordado adiante, os indivíduos com doenças profissionais ou medicamentos essenciais para a manutenção da vida, como as insulinas. Numa receita manual é possível verificar qual o regime de comparticipação sob o qual o utente está abrangido. A letra “O”, no cabeçalho de identificação do utente, corresponde ao regime geral e a letra “R” identifica os utentes reformados e com pensão inferior ao salário mínimo nacional. No sistema eletrónico, o programa faz esta seleção automaticamente (94-96).

Atualmente facilitado pelo sistema eletrónico, compreender qual a entidade e o sistema de comparticipação em que o utente se inseria, constituía uma grande dificuldade para o Farmacêutico, pela difícil comunicação com muitos utentes e pelo elevado número de planos existentes. Aquando da introdução de uma receita manual, a não introdução do Plano de

Comparticipação respetivo, ou a introdução de um plano errado leva a que a receita seja rejeitada pelos serviços centrais do Centro de Conferência de Faturas, do SNS, com possíveis encargos para a FM ou utente.

Em Portugal, todo e qualquer cidadão tem direito, por força da Constituição de 2 de abril de 1976, à prestação de cuidados de saúde tendencialmente gratuitos. Assim sendo, todo e aquele que, por nascimento, inerência ou aquisição da nacionalidade portuguesa se apresente ao cuidado do Serviço Nacional de Saúde, SNS, tem direito a ver os seus medicamentos comparticipados pelo Estado. O SNS nasce precisamente do disposto na Constituição, pelo DL nº 56/79 de 15 de setembro. No entanto, e ainda dentro do SNS existe um elevado número de planos e opções diferentes que é necessário ter em consideração. Alguns exemplos poderão ser os doentes com diabetes, lúpus ou doença oncológica. Também os utentes reformados usufruem dum plano diferente de comparticipação, variando ainda este com a pensão mensal que a Segurança Social paga (97,98).

Por outro lado, a Constituição também consagra a existência de sistemas de saúde paralelos de origem privada, cabendo ao legislador a regulação dos mesmos. Assim sendo, os referidos sistemas de saúde usufruem também de sistemas de comparticipação privados, sendo os mesmos sempre complementares ao SNS, que como referido, é válido para todos os cidadãos.

Por fim, existem ainda fundos contributivos, os quais os trabalhadores financiam com parte do seu salário, pagando estes uma parte do valor dos medicamentos, desde que utente se faça identificar como beneficiário dos referidos fundos. Alguns sistemas bancários, sindicatos ou seguros oferecem também sistemas de complementaridade, diminuindo o custo para o utilizador. Cabe ao Farmacêutico a gestão destas situações.

No caso particular da Vila de Tortosendo, que conforme referido tem um forte passado industrial, são extremamente frequentes os utentes que usufruem do Fundo Especial de Segurança Social do Pessoal da Indústria de Lanifícios, merecendo este caso especial destaque. Até à data de 9/1/17, todas as receitas passadas em nome de utentes que integrem o referido Fundo, deveriam ser reencaminhadas para o Centro de Saúde do utente para que o mesmo fosse ressarcido dos seus gastos pela Administração Regional de Saúde territorialmente competente. No entanto, com a entrada em vigor da Portaria nº 287/2016, o utente passa a usufruir da comparticipação estipulada diretamente na farmácia, diminuindo o valor total a pagar pelo utente e facilitando a burocracia. No entanto, durante grande parte do estágio, verificou-se uma série de erros informáticos produzidos pela Administração Central que impediram a correta faturação das receitas e que se mantiveram durante mais de um mês. Sendo os beneficiários deste fundo sobretudo idosos, verificou-se uma enorme dificuldade em explicar a situação vigente, já que os valores pagos pela mesma medicação variaram ao longo do período em que o referido erro perdurou (99,100).

### 5.3. Requisitos para a Dispensa, Validade, Caducidade e Veracidade da Receita Médica

Aquando da receção duma Receita Médica, em particular uma receita manual, é necessário conferir uma série de requisitos para garantir a veracidade e validade da mesma. A não validação adequada da receita médica tem como última consequência a não devolução do valor da comparticipação devida pelo Estado à farmácia, ficando esta lesada no valor correspondente.

Toda a receita médica manual tem de se encontrar em suporte físico apropriado, usando o modelo 1806, definido pelo Ministério da Saúde, caso se trate de uma receita inteiramente manual. Tem de identificar o utente, o médico, o regime de comparticipação e tem de possuir uma vinheta autenticável que identifique o clínico prescriptor. Tem um limite máximo de quatro medicamentos por receita e por esse motivo é frequente doentes polimedicados trazerem várias receitas simultaneamente. A medicação a dispensar tem de se encontrar com caligrafia legível, identificar a dosagem pretendida e o número de unidades a dispensar. Caso estas indicações sejam omissas o Farmacêutico deve dispensar a medicação na dosagem mais baixa e com o menor número de unidades por embalagem existente. A receita é apenas válida se todos os campos se encontrarem preenchidos e se estiver dentro da validade de 30 dias após a prescrição.

Atualmente, com a receita eletrónica, o sistema faz a conferência de forma automática, não sendo possível a dispensa de medicamentos que não constem na folha de prescrição, nem de medicamentos em formas farmacêuticas, dosagens ou quantidades diferentes das prescritas. O limite de medicação por receita foi levantado, e agora é possível prescrever até seis embalagens duma mesma substância, para facilitar o levantamento da medicação dos doentes crónicos. Também a validade foi estendida bem além dos 30 dias. Na folha de prescrição, que muitas vezes não é entregue ao doente em detrimento de uma mensagem no telefone, constam apenas dados como o número de receita, o código de acesso, o código de opção, nome do utente e do prescriptor. Em caso de falência do sistema informático é possível encontrar *QR Codes*, no fundo da folha para permitir a dispensa em modo *offline*. No entanto, tal situação não aparenta ser frequente. Numa receita eletrónica, os dados de acesso permitem ao Farmacêutico conhecer o nome do utente a quem foi prescrita a medicação e o médico prescriptor, ainda que o utente não apresente a folha de terapêutica. Esta informação é visível em campo próprio através do SIFARMA 2000.

As receitas faturadas de forma inteiramente eletrónica dispensam o envio de qualquer tipo de documento físico para o Centro de Conferência de Faturas. A comunicação com este é inteiramente eletrónica. No entanto, as receitas são faturadas e ordenadas por lotes de 30 receitas, de forma idêntica às demais.

#### 5.4. Situações Especiais de Dispensa - Psicotrópicos, Estupefacientes, Benzodiazepinas

Como referido, a receção deste tipo de fármacos está salvaguardada com um registo especial, sendo o envio do mesmo obrigatório com uma periodicidade estabelecida para o caso dos psicotrópicos e estupefacientes. O consumo de psicotrópicos está regulado pelo DL nº 15/93, alterado pelo DL nº 77/2014. Relativamente à dispensa, no caso destes últimos, a mesma está sujeita a um registo especial, sendo necessário software devidamente autorizado, conforme contemplado no DL nº292/2005. Assim sendo, em cada momento de dispensa é necessário pedir ao adquirente a sua identificação, sendo necessário introduzir os dados no formulário pedido pelo SIFARMA. Este registo é obrigatório. Após a dispensa é emitido um comprovativo em duplicado que refere a própria dispensa. Este comprovativo é mantido em arquivo durante um período mínimo de três anos. Mensalmente, é necessário enviar ao INFARMED uma cópia das receitas manuais e do registo de saídas, produzido pelo programa SIFARMA, até ao dia 8 do mês seguinte à faturação. A cada ano, até 31 de janeiro, é obrigatório o envio do mapa de balanço à mesma entidade. Atualmente, para o caso das benzodiazepinas, não é necessário um registo especial, além da identificação de entrada feita pelo SIFARMA. A lista de substâncias psicoativas permitidas está publicada em Diário da República, pela Portaria nº 154/2013 (101-104).

### 6. Aconselhamento Farmacêutico e a Relação Deontológica Utente-Farmacêutico

#### 6.1. Posicionamento Deontológico do Farmacêutico Comunitário

Diariamente o Farmacêutico é confrontado com novas responsabilidades, necessidade de decisões e opções que, a limite, jogam com a vida, a saúde e o bem-estar do utente. O nosso posicionamento deveria ser firme em relação a certos aspetos, mas anos de alguma má prática e um relativo desleixo, levaram a que atualmente o nosso aconselhamento e autoridade enquanto profissionais máximos do medicamento não sejam levados tão seriamente como se deveria. Também as opções de legislaturas recentes face à política do medicamento levaram a que o medicamento seja hoje encarado com muito menos seriedade do que há 20 anos atrás. O Farmacêutico tem estipulado no seu código deontológico o dever para com o utente, com a confidencialidade e com a prática do bem enquanto valor máximo. Face à crise que assola o setor da farmácia comunitária, as farmácias não se encontram numa posição confortável para recusar a dispensa de medicação, ainda que contra os preceitos do Farmacêutico, quando é a sobrevivência da farmácia que está em jogo. Ainda assim, a Farmácia Moderna prima por não dispensar qualquer medicamento a qualquer pessoa que o requeira.

## 6.2. Automedicação - Aconselhamento Farmacêutico

De um ponto de vista estritamente técnico, os medicamentos dispensados por um Farmacêutico são sempre considerados como automedicação. Seria hipócrita da nossa parte referir que nenhum medicamento sujeito a receita médica é dispensado a nível de qualquer farmácia. A farmácia tem de ser defendida como parte integrante do Serviço Nacional de Saúde que na prática já é, e o legislador tem de estabelecer medidas que visem uma genuína inclusão da farmácia no mesmo. O senso comum, confirmado pelos dados, diz-nos que uma percentagem elevada da população desloca-se primeiro a uma farmácia antes de aceder aos cuidados de saúde hospitalares, ou ainda antes de se deslocar ao seu Médico de Família. Um esforço por parte do Estado, no sentido de promover as farmácias como rede primária de cuidados de saúde, pode desviar dos hospitais e centros de saúde uma quantidade elevada de pessoas com afeições menores e desta forma resultar em significativa poupança para o SNS.

O Aconselhamento Farmacêutico tem de ser progressivamente mais considerado pelos utentes, respeitado e valorizado. A criação de listas de medicamentos de dispensa exclusiva em farmácia, já em implementação, e a desliberalização do uso do medicamento fora do contexto de espaços de saúde ou sob aconselhamento de profissionais de saúde são medidas urgentes para restabelecer a importância e a responsabilidade do uso do medicamento, que tem de deixar de estar exposto em caixas de supermercado ou bombas de gasolina, cujos profissionais responsáveis não se encontram, ainda que remotamente, qualificados para a dispensa responsável de medicamentos (86,93).

Verificamos que a experiência do Farmacêutico é, de forma geral, bem aceite, e os conselhos prestados por este são tidos em consideração pelos utentes. No entanto, a ação do Farmacêutico é restringida pela legislação em vigor, com a dispensa de medicação a ser considerada automedicação. Ainda assim é necessário conhecer o conceito de “Automedicação Responsável”, já referido, e que representa o ato de dispensa sob a supervisão Farmacêutica. Esforços importantes têm sido feitos no sentido de dotar o Farmacêutico de ferramentas legais para a dispensa responsável, como por exemplo, a criação da lista de medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia. É importante continuar a promover a figura transversal do Farmacêutico. Por este motivo é necessário lutar pelo conceito de automedicação responsável, tutelada por um Farmacêutico e seguida de perto pelo mesmo. Só desta forma, e com esta dedicação, é possível assegurar que um curso de tratamento estabelecido tem objetivos definidos e recebe o acompanhamento necessário, inerente à toma de medicação. O Farmacêutico deve primar por impor medidas não farmacológicas, ou pelo menos, acompanhar a terapêutica de referidas medidas. Não deve ter uma perspetiva apenas económica, mas sim de prestar um serviço público de qualidade.

### 6.3. Medicamentos Sujeitos a Receita Médica Vs. Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

O Farmacêutico é diariamente confrontado com afeções de saúde menores, que não constituindo emergências médicas são passíveis de resolução com medicamentos disponíveis na farmácia. Embora a legislação seja clara, há efetivamente alguma margem de manobra que permite ao Farmacêutico a dispensa de medicamentos, na forma de automedicação responsável, como referido. Também, com frequência, o utente exige a dispensa de medicamentos sem receita médica. Nestas situações o Farmacêutico tem de pesar os fatores em questão de forma a efetuar sempre uma dispensa responsável. A legislação em si, no entanto, não ajuda e é fator de confusão para os utentes, que não entendem o porquê de algumas marcas de ibuprofeno 400 mg serem sujeitas a receita médica e outras não. O mesmo exemplo aplica-se ao paracetamol, sendo do conhecimento geral que uma dose de 1 g é adequada para a população adulta, e verifica-se alguma dificuldade das pessoas em compreender que a dispensa é sujeita a receita médica.

Um medicamento sujeito a receita médica é um medicamento que preenche, pelo menos, uma das seguintes condições, de acordo com o estipulado na legislação em vigor:

- a) Possa constituir risco para a saúde do doente, mesmo quando usados para o fim adequado, sem supervisão médica;
- b) Possa constituir um risco para a saúde quando sejam utilizados com frequência ou quantidades diferentes do fim a que se destinam;
- c) Conttenham substâncias cujo estudo de possíveis reações adversas seja necessário aprofundar;
- d) Destinem-se a ser administrados por via parentérica.

Um medicamento não sujeito a receita médica não é participado pelo Estado, salvo situações especiais, e tem indicações terapêuticas passíveis de automedicação, de acordo com o estipulado no Despacho n° 17690/2007 (105).

Podemos ainda considerar medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia, previstos pela Deliberação n°24/CD/2014, de que são exemplo algumas preparações tópicas como o Picalm®, como referido anteriormente (106).

### 6.4. Dispensa de Outros Produtos de Saúde

Nas últimas décadas as farmácias foram confrontadas com dificuldades crescentes em termos de faturação e lucro. Dados recentes referem que 19,3% das farmácias encontram-se em processo de insolvência (11/2016), e 69% das farmácias apresentam um resultado líquido negativo médio de 9753€. Estes dados são inequívocos no que diz respeito a demonstrar que o

setor se encontra mergulhado numa grave crise económica. A cosmética, higiene, suplementos e outros artigos de saúde são hoje encontrados na farmácia, aliados a um aconselhamento especializado e incomparável com outros locais de venda, e representa uma fatia larga do *income* das farmácias. Na Farmácia Moderna é possível encontrar um largo *stock* de produtos vários e é muito procurada pelo apoio ao utente na hora de escolher produtos das várias linhas disponíveis, sendo que os utentes têm noção que o tipo de atendimento, apoio e colaboração que encontram aqui não tem rival (107).

Na Farmácia Moderna é possível encontrar, em local de acesso ao utente, vários produtos de saúde, dispostos como referido anteriormente, organizados em secções, com várias linhas distintas e marcas diferentes. Podem-se encontrar produtos de cosmética, nutrição infantil, fitoterapia, puericultura, sexualidade, higiene, entre outros. O contacto com este tipo de produtos permite adquirir uma experiência que preenche uma lacuna formativa a vários níveis.

Os dispositivos médicos são outro tipo de artigos de extrema importância fornecidos pelas farmácias. Contrariamente à crença popular, os dispositivos médicos podem ser encontrados inclusive na forma de xaropes ou pastilhas. Alguns xaropes para a tosse de origem natural apresentam esta classificação. O DL nº 145/2009 define “Dispositivo médico” como “qualquer instrumento, aparelho, equipamento, software, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, (...) cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos (...)”. Os dispositivos médicos são classificados por risco para o utente, numa escala de 4 níveis, I, IIa, IIb, III, de risco crescente para este. Foi possível um contacto alargado com este tipo de produtos, sendo o aconselhamento Farmacêutico vital para a promoção de um uso adequado dos mesmos. Exemplos destes produtos são as seringas e agulhas, material destinado a proteção individual ou proteção de feridas e lesões, material ortopédico, produtos para doentes colostomizados, entre outros (108).

## **7. Cuidados de Saúde e Serviços Oferecidos na Farmácia Moderna**

### **7.1. Quantificações Bioquímicas**

A Farmácia Moderna oferece um conjunto de determinações bioquímicas passíveis de ser realizadas no gabinete existente nas instalações da mesma. A realização destas medições permite não só um mais completo seguimento farmacoterapêutico, mas também a deteção precoce de determinadas patologias, sendo por isso uma parte essencial integrante dos cuidados de saúde fornecidos no âmbito da farmácia comunitária. Desta forma conseguem-se

despistar patologias de forma atempada, o que permite obter ganhos não apenas em saúde, mas também a nível socioeconómico.

Assim sendo, na FM é possível determinar os níveis de glicémia capilar, colesterol total e triglicéridos, de forma confortável, cómoda e rápida para os utentes desta farmácia.

O processo de medição é realizado de forma higiénica, no gabinete existente para o efeito, tendo as boas práticas farmacêuticas sempre em vista, aplicando o protocolo estabelecido. Idealmente tenta-se iniciar o equipamento de medição de colesterol pela manhã. O equipamento, como descrito acima, é um Reflotron Plus®, da Roche®, caracterizado por ser preciso e eficiente. Utilizando luvas durante o processo, o Farmacêutico efetua a desinfecção do local de punção recorrendo a álcool etílico 70%, aguardando uns segundos para ocorrer a evaporação do mesmo. De seguida, faz-se a punção, utilizando a face lateral do dedo indicador, médio ou anelar, tendo em atenção temperatura da mão e fatores que afetem a circulação, como anéis ou relógios. A referida punção é realizada com uma lanceta descartável e estéril Ames Minilet Lancet, Bayer®. O equipamento de medição da glicémia capilar, Verio®, One Touch® requer uma pequena gota de sangue, aplicada diretamente na tira descartável. O resultado é obtido de imediato. O equipamento de medição de colesterol e triglicéridos, no entanto, requer a aplicação duma gota de sangue maior, sendo necessário recolher algum sangue para um capilar. A partir do capilar, recorrendo a uma pequena pipeta, o sangue é então depositado na tira de medição, sendo o resultado obtido poucos minutos depois. Os resíduos resultantes são descartados de forma adequada, usando os contentores de perfuráveis e resíduos biológicos existentes para o efeito. O Farmacêutico analisa e discute os resultados com o utente, registando os valores num cartão próprio para o efeito. Os resultados podem ser registados na ficha do utente, a nível do programa SIFARMA 2000, aquando da faturação do serviço prestado.

## 7.2. Determinações Antropométricas

A Farmácia Moderna dispõe de equipamento para a medição do peso, altura e pressão arterial do utente da Affinity Group®, como descrito anteriormente, na zona de atendimento ao público da farmácia. Para os utentes que assim o desejem, a medição da pressão arterial pode ainda ser realizada a nível do gabinete, existindo também aí equipamento para o efeito.

Este serviço permite ao Farmacêutico recolher os dados necessários para o cálculo do Índice de Massa Corporal, IMC, e fornecer aconselhamento a nível de estilo e hábitos de vida e direcionamento médico caso o entenda. A determinação do IMC é a forma mais standardizada de avaliar e comparar a massa corporal do utente. As *guidelines* da Organização Mundial de Saúde recomendam a utilização deste parâmetro para quantificar a

possibilidade de distúrbios alimentares. O cálculo do IMC faz-se com recurso à equação 4, abaixo.

$$IMC = \frac{Peso (Kg)}{Altura^2(m)} \quad (4)$$

### 7.3. Medição da Pressão Arterial

Como parte integrante dos Serviços de Saúde oferecidos pela Farmácia Moderna, a medição da pressão arterial permite ao utente a quantificação ocasional ou esporádica da mesma, quando o utente o solicite, e facilita o seguimento do efeito da terapêutica direcionada nesse sentido. Tal recolha e registo de dados permite inclusive ao Médico Prescritor um ajuste da terapêutica, se necessário, e leva o doente a implementar mudanças no seu estilo de vida e aumentar a adesão à terapêutica prescrita.

O Farmacêutico, aquando do pedido por parte do utente de medição da pressão arterial, questiona o mesmo sobre como se deslocou à farmácia, se se encontra cansado, com calor, particularmente ansioso ou nervoso, se consumiu café, outras bebidas estimulantes ou álcool. Descarta-se assim a possibilidade de obter um resultado menos adequado ou fidedigno. Se o utente referir que se encontra ofegante ou cansado da deslocação até à farmácia é convidado a sentar-se e a aguardar alguns minutos. De seguida é então pedido a este que se sente confortavelmente, não cruzando braços e pernas e mantendo as costas direitas. Deve ser pedido ao utente que remova relógios ou pulseiras demasiado apertadas. Como referido, pode ser utilizado o equipamento comum disponível na sala de atendimento ou o medidor de braço no gabinete, Tensoval® Duo Control. As indicações são, em ambos os casos, idênticas. Após a medição o Farmacêutico efetua o aconselhamento devido, a nível de alterações de estilo de vida ou alimentares e encaminha o utente para um médico se necessário. Os valores são registados num cartão próprio para o efeito e na ficha do utente no programa SIFARMA 2000.

### 7.4. Acompanhamento Nutricional

Além do aconselhamento nutricional e de alteração no estilo de vida inerente à prestação de Cuidados Farmacêuticos, associada as medições de glicémia, colesterol, pressão arterial e IMC, a Farmácia Moderna disponibiliza um serviço de nutrição, recorrendo a um acordo de prestação de serviços. O serviço é realizado quinzenalmente nas instalações da farmácia. É um serviço de proximidade, com um custo associado, que une os utentes a um estilo de vida saudável e os ajuda a atingir os seus objetivos.

### 7.5. Administração de Injetáveis

A Farmácia Moderna conta com quatro Farmacêuticos. Dois destes estão devidamente habilitados para a administração de injetáveis, nomeadamente medicamentos por via

intramuscular ou subcutânea e também vacinas. O papel de promoção de hábitos de saúde é transversal à figura do Farmacêutico e este auxilia também a população diabética a como trabalhar com os equipamentos de medição de glicemia e administração de insulina. Apesar do esforço feito pelos profissionais de saúde nos hospitais, os utentes recém diagnosticados chegam muitas vezes às farmácias com muitas dúvidas, prestando o Farmacêutico um serviço de apoio e esclarecimento fundamental. O Curso Inicial de Vacinas e Administração de Medicamentos Injetáveis, reconhecido, é lecionado pela Ordem dos Farmacêuticos.

## **7.6. Sistemas Personalizados de Dispensação**

Outro dos serviços disponibilizados pela Farmácia Moderna é a preparação individualizada da medicação. Este serviço é particularmente importante a nível da população idosa, frequentemente polimedicada, com tendência a sofrer de confusão, esquecimentos e outras situações que acabam por prejudicar o cumprimento da terapêutica. Este serviço agrupa a medicação por segmentos do dia, todos os dias da semana. A preparação começa com a limpeza dos recipientes onde se arruma a medicação, uma pequena caixa de plástico com 4 separadores, conforme o momento do dia a que se destina a toma do medicamento. Usando técnicas de higiene adequadas, os medicamentos são repostos todas as sextas-feiras. Idealmente a preparação será revista por outro Farmacêutico para minimizar a possibilidade de erros de medicação. Este serviço tem um pequeno custo associado.

## **8. Preparação de Manipulados**

### **8.1. Disposições Legais**

Qualquer farmácia tem de estar preparada para a possibilidade de ter de preparar um manipulado ou um preparado oficial. Um “medicamento manipulado” é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um Farmacêutico”, conceito estabelecido pelo DL nº 95/2004. Embora esta fosse uma das principais valências do Farmacêutico, a industrialização e inovação tecnológicas que se verificaram nos últimos 50 anos levaram a que a preparação de um manipulado seja hoje esporádica. Ainda assim, é estipulado pela Deliberação nº 1500/2004 a existência de material de laboratório obrigatório. Na tabela 18 encontra-se listado o material obrigatório (109,110).

Os medicamentos manipulados podem ser dispensados por ordem de receita médica, sendo considerados fórmulas magistrais, ou podem ser preparados por pedido do doente, sendo que nesse caso são denominados de preparados oficiais. Os medicamentos manipulados são prescritos contendo indicações para o Farmacêutico sobre a composição do mesmo, nomeadamente informação sobre as substâncias ativas, concentração, excipientes e forma farmacêutica desejada. Os medicamentos manipulados são comparticipados em 30% pelo Estado, caso se verifique uma lacuna terapêutica a nível dos medicamentos industriais,

necessidade de adaptar dosagens ou formas terapêuticas a populações especiais (pediatria ou geriatria) ou em caso de provada inexistência no mercado com igual substância ativa na forma farmacêutica desejada, conforme disposto no DL nº 95/2004 (109).

Tabela 18: listagem do material de laboratório de presença obrigatória. Adaptado de documento interno da farmácia Moderna.

Alcoómetro
Almofarizes de vidro e de porcelana
Balança de precisão sensível ao miligrama
Banho de água termostaticado
Cápsula de porcelana
Copos de várias capacidades
Espátulas metálicas e não metálicas
Evidência de calibração anual
Evidência de verificação metrológica
Funis de vidro
Local de lavagem de material com água corrente
Matrizes de capacidades várias
Papel de filtro
Papel indicador de pH universal
Pedra de preparação de pomadas
Pipetas graduadas
Provetas graduadas de capacidades várias
Sistema de exaustão
Tamises FP VII de fundo e tampa, diâmetro de 180 µm a 355 µm
Termómetro
Vidros de relógio

## 8.2. Matéria-Prima, Preparação e Garantia de Qualidade

Para assegurar a preparação dos manipulados quando assim for pedido, a Farmácia Moderna tem de assegurar a existência em stock de alguns excipientes e matéria primas fundamentais. Assim sendo, podemos encontrar, sob adequadas condições de conservação, reagentes e matérias primas, ácido tartárico, potássio metabissulfito, etanol, ácido salicílico, vaselina sólida, água purificada, corantes, ácido bórico, entre outros.

Todos os manipulados são preparados na área de laboratório sob estritas condições de higiene, adequadas à preparação que se está a realizar e ao fim a que se destina. De uma forma geral, independentemente do manipulado realizado, é necessário começar por uma correta higienização da bancada de trabalho, de preparação e limpeza do equipamento a

utilizar e ainda verificação dos reagentes e matérias primas a utilizar, nomeadamente em termos de prazo de validade, condições de conservação, data de abertura, e condições de manipulação. De seguida, recorrendo às folhas de preparação de manipulados ou ao Formulário Galénico adequado, efetua-se a preparação, tendo em consideração os cuidados necessários. Termina-se a preparação do manipulado com a limpeza do equipamento e espaço de trabalho, arrumação do material, conclusão do rótulo e cálculo de preço, que serão abordados abaixo.

### **8.3. Documentação, Rotulagem e Dispensa do Medicamento Manipulado**

Para se proceder à preparação de manipulados de acordo com legislação e com as Boas Práticas, e também para responder às exigências burocráticas do INFARMED é fundamental manter um arquivo completo relativo do material, equipamento, excipientes e matérias primas necessárias. Assim sendo, é pedido um registo de calibração de equipamentos, nomeadamente balanças, medidores de pH ou termómetros, um registo das folhas de segurança e boletins de análise de todos os excipientes e matérias primas utilizadas, entregue pelo fornecedor. Por cada manipulado deverá ser preparada e arquivada a ficha de preparação do medicamento manipulado, que deverá conter, entre outros, a denominação do medicamento preparado, um registo do doente e do prescritor, o modo de preparação, o acondicionamento primário, o lote, a composição, com indicação dos dados da matéria prima, nomeadamente quantidades, lotes e validades e ainda o número do lote. O procedimento deverá ser conferido e validado, sendo pedida a assinatura e data de Farmacêutico que preparou e validou o manipulado. Este registo é mantido na farmácia durante 3 anos.

A acompanhar qualquer manipulado que seja dispensado deve seguir um rótulo preparado para o efeito, devendo indicar o nome do utente a que se destina, a fórmula que contém, a validade estimada, indicações de conservação, posologia, identificação da farmácia, via de administração, instruções de uso (como “agitar antes de usar” ou “uso externo”) e claro o lote atribuído.

## **9. Contabilidade e Gestão**

### **9.1. Gestão Financeira**

Como referido anteriormente, as farmácias, de modo geral, encontram-se numa situação delicada em termos económicos. Referindo o estudo citado anteriormente, verifica-se que a dispensa média numa qualquer farmácia tem um valor financeiro de 13,51€. Destes, ao retirarmos o custo com o pessoal, com o medicamento, custos de funcionamento e outros, como juros ou amortizações, a farmácia perde 0,17€. Isto significa que a venda média traz, tecnicamente, prejuízo à farmácia (107).

O setor da farmácia comunitária sofreu uma profunda alteração ao largo dos últimos 10 anos. Embora a crença popular seja considerar as farmácias como enormes fontes de rendimento, a alteração radical no preço dos medicamentos, com benefício para o Legislador e para o utente, repercute-se numa perda substancial para a farmácia. A liberalização do mercado do medicamento trouxe consigo profundas alterações à dinâmica. Do ano de 2013 para 2014 verificou-se um aumento de apenas 4 farmácias, de 2915 para 2919, registando-se vários encerramentos e reaberturas. No entanto o número de locais de venda de MNSRM, em período homólogo, passou de 952 para 1013. Esta é uma tendência que se espera que continue a aumentar. A excessiva liberalização do mercado do medicamento, além do prejuízo para a farmácia, leva a que as pessoas encarem a toma de medicação com extrema leviandade, não estando preparadas para os efeitos nefastos da mesma (107).

A alteração na conjuntura demonstrou que muitas farmácias, e muitos Farmacêuticos, não estavam preparados para as dificuldades enfrentadas, explicando os elevados números de penhora de insolvência (em 2014 haviam em insolvência 169 farmácias e em penhora 323). A Gestão é por todos estes motivos uma ferramenta fundamental para a manutenção do negócio. A farmácia Comunitária é um local extremamente controlado, no que diz respeito à legislação aplicável em vigor. Nada pode ser deixado ao acaso, desde licenças de funcionamento a licenças de áudio, tudo sob o apertado controlo do INFARMED e várias outras entidades fiscalizadoras. Há uma necessidade imperiosa não de apenas vender muito, mas vender bem, tendo em conta a rentabilidade individual de cada produto e uma perfeita gestão do stock. As margens são de tal forma reduzidas (verifica-se que muitas vendas têm, na verdade, um impacto negativo na farmácia, como referido) que é necessário um controlo apertado não só das compras e vendas, mas também dos gastos fixos inerentes (107).

O Farmacêutico com papel de Gestor, sendo que na Farmácia Moderna tal papel está quase exclusivamente remetido ao Dr. Fernando Campos, que dedica uma enorme parte do seu tempo a garantir o correto funcionamento da farmácia, passando as suas funções pela gestão de stocks, realização de encomendas, negociação de melhores condições para a farmácia, gestão de pessoal, construção planos de trabalho, organização da inúmera documentação de presença obrigatória na farmácia, desde livros científicos a manuais de Boas Práticas e gestão da qualidade e respetivos procedimentos documentados.

A existência de uma figura dedicada quase em exclusivo para as questões de gestão e outra para a contabilidade, permite, além de rentabilizar o tempo disponível dos demais Farmacêuticos para o atendimento e outras questões fulcrais, uma maior dedicação e visão geral dos processos em curso, que pela delicadeza e importância patentes são melhor geridos por uma única pessoa do que dividindo tarefas em equipa.

## 9.2. Conferência do Receituário

A conferência do receituário, o complexo processo de verificação individual, extensiva e repetitiva verificação das receitas manuais e eletrônicas em papel é hoje uma fração do que era ainda há poucos anos atrás. Com o advento da receita inteiramente eletrônica, a receita manual está hoje remetida para 4 situações apenas, sendo estas a falência informática, inadaptação do prescritor, prescrição no domicílio e um limite de 40 receitas por mês. A não conformidade de uma receita leva ao não pagamento da participação do Estado à farmácia. Tendo em conta as pequenas margens que o setor da farmácia comunitária usufrui, a acumulação de uma série de pequenos e quase impercetíveis erros nas receitas leva indubitavelmente ao que podem ser perdas económicas significativas. Daí a imperiosa necessidade de extensa verificação do receituário. Na Farmácia Moderna, este papel está maioritariamente atribuído à Diretora Técnica da mesma. Assim, no local de receção de encomendas, são organizadas, em local próprio, as receitas que vão sendo recolhidas das gavetas nos balcões de atendimento. Estas receitas são organizadas por lotes, de acordo com o organismo em que se inserem, ou seja, o plano de participação correspondente.

O programa SIFARMA 2000, de forma automática, contabiliza e ordena as receitas por ordem de introdução, associando de imediato um número à mesma, no momento de dispensa da medicação. Ao atingir a 30ª receita em papel completa-se o lote. Cada lote contém receitas de apenas um organismo. Assume-se que a receita foi já validada, estando já conferidos os dados fundamentais, como autenticidade, validade, assinatura e modelo de impressão conforme referido anteriormente, pelo Farmacêutico que efetua a dispensa. Durante a dispensa, um recibo que indica os medicamentos dispensados, o lote e número de receita a data, operador e outros elementos fundamentais é impresso no verso da receita manual ou eletrônica em papel. Naturalmente que o primeiro ponto de verificação passa por garantir, ainda na dispensa, que a medicação entregue ao doente corresponde efetivamente à prescrita pelo clínico, com especial atenção à dosagem e unidades por embalagem. O verso da receita tem de ser carimbado, e assinado pelo Farmacêutico responsável, indicando a data. Todo este processo não implica, no entanto, que a receita não apresente ainda outro tipo de não conformidades. Se a receita apresentar, rasuras, riscos, falta de algum dado do utente, ou do médico (nomeadamente a assinatura do mesmo, vinheta deste e vinheta do local de prescrição, quando aplicável), códigos de barras ilegíveis ou cortados, receita indevidamente cortada ou em péssimo estado de conservação, rasuras, caligrafias diferentes, não utilização do impresso ou modelo adequado para a prescrição médica ou outros aspetos considerados impeditivos ou de não conformidade pelo Centro de Conferência de Faturas do Serviço Nacional de Saúde, levam, sem dúvida, à devolução da receita pelo referido centro.

Após a conferência manual do receituário, e após se encerrar o lote, deverá ser impresso, através do SIFARMA, um verbete por lote, onde está disposto o número da receita, dados

gerais, valor pago pelo utente, e valor da comparticipação. Este verbete deverá ser anexado ao lote, fisicamente, considerando-se assim o lote efetivamente fechado e pronto para remessa. À medida que o mês decorre, os lotes vão sendo encerrados e verificados ao atingir as 30 receitas, evitando acumular trabalho para o final do mês.

As receitas eletrónicas sem papel processam-se e organizam-se de forma similar. O processamento da mesma é feito de forma praticamente automatizada, existindo uma categoria própria para o efeito, sendo agrupadas no mesmo lote. Com este tipo de receita, não é necessário qualquer tipo de conferência ou verificação. As receitas eletrónicas com papel, porém, correspondentes ao organismo 99, são agrupadas em lotes de 30.

No final de cada mês civil seguinte realiza-se o fecho, onde se faz a conferência final e preparam-se os lotes para remessa para o Centro de Conferência de Faturas. Qualquer lote que não tenha sido completo, ou seja, não tenha atingido o valor de 30 receitas, é encerrado e procede-se de igual forma. Nos primeiros dias do mês, as receitas são fisicamente enviadas para o CCF, ficando a farmácia a aguardar o pagamento da comparticipação por parte do Estado. O CCF, após conferir o receituário enviado pela farmácia, remete depois uma listagem com as receitas consideradas não conformes, tendo a farmácia oportunidade de retificar algum aspeto, quando possível.

### 9.3. Faturação

Embora nalgumas farmácias a faturação e contabilidade seja feita de forma interna pelos próprios Farmacêuticos, a maioria recorre a empresas externas para garantir um correto acompanhamento dos múltiplos aspetos relacionados com a faturação.

Na Farmácia Moderna, a contabilidade, como referido, está a cargo do Gerente, Sr. José Manuel Campos, contabilista certificado, que passa grande parte do dia na farmácia e é responsável pela área contabilística, tendo entre outras funções: realizar os balanços de caixa no final do dia, gerir o financiamento da farmácia, pagar faturas e conferir os valores das mesmas, etc.

Foi possível, através do contacto íntimo com o quotidiano e tarefas diárias na FM, conhecer e aprender a distinguir vários conceitos do mundo da gestão e contabilidade, como compreender a diferença entre uma guia de remessa e uma fatura, ou distinguir os diferentes tipos de impostos que são imputáveis à farmácia.

#### 9.4. Relações Externas

A Farmácia Moderna, como qualquer outra, é uma instituição aberta e que recebe constantes notícias e atualizações. A FM recebe com frequência visitas de representantes de vários fornecedores e laboratórios e delegados de informação médica, fazendo parte do quotidiano. Estes, além da componente comercial, apresentam também os resultados de estudos de segurança ou eficácia relativos aos fármacos que comercializam. Por outro lado, também instituições proeminentes do setor farmacêutico comunicam diariamente com as farmácias, nomeadamente a Associação Nacional das Farmácias, que trabalha perto dos seus associados. Por fim, verifica-se existir uma estreita relação entre a FM e todos os parceiros, fornecedores e distribuidores.

#### 9.5. Arquivo Documental

As farmácias são obrigadas, pela legislação em vigor, a manter um arquivo documental para determinados documentos. Um desses exemplos são os registos de dispensa de psicotrópicos e estupefacientes, que são mantidos durante os três anos seguintes à data de emissão. Também os mapas de balanços são guardados. Como referido anteriormente, também os registos de preparação de manipulados deverão ser mantidos na farmácia. Além da documentação obrigatória por lei, encontram-se na Farmácia Moderna, uma série de registos de uso interno, estritamente organizados em portefólios e capas adequadas, que asseguram todos os intrínsecos parâmetros legais estabelecidos, como manuais de procedimentos, fluxogramas vários ou manuais de controlo de qualidade. Também alguma da correspondência recebida é registada por data de chegada e arquivada adequadamente, embora muita da comunicação se faça, naturalmente, por via eletrónica. Podemos ainda encontrar comprovativos de emissão de crédito aos utentes, registo de devoluções, notas de crédito e faturas emitidas pelos fornecedores e distribuidores que prestam serviço à FM.

### 10. Conclusão

A farmácia comunitária é uma área demasiado abrangente, impassível de ser resumida no limitado espaço desta dissertação. Durante os quase três meses de árduo trabalho na Farmácia Moderna foi possível conhecer o bom e o mau da Prática Farmacêutica. Esta foi uma experiência extremamente enriquecedora e apaixonante. Não poderia ser imaginado um melhor corolário de 5 anos de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. A experiência que não se deixa escrita foi, seguramente, vivida na primeira pessoa e em primeiro plano. A FM não limita a atuação do estagiário, integrando-o na sua equipa desde o primeiro dia. Esta é a principal vicissitude que marcou este período de aprendizagem.

A formação universitária nunca pode ser considerada concluída sem que o aluno ponha à prova os conhecimentos obtidos. O estágio é a ferramenta magistral para atingir este

objetivo. Ao longo da caminhada dúvidas surgiram, mas a prática traz uma resposta e uma certeza que não consegue ser obtida em livros e sebatas.

Esta é uma profissão de constante aprendizagem, viva e interessante. A estagnação é inimiga da ciência e dos Farmacêuticos, devendo ser evitada a todo o custo. De igual modo, a luta por condições dignas de trabalho e o reconhecimento do valor do Farmacêutico deve ser sempre prioridade de qualquer estudante do MCF, para garantir que o Profissional da Farmácia continua sempre na vanguarda da saúde da população.

# Capítulo 3 - Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar

## 1. Introdução

O estágio em farmácia hospitalar é parte integrante da Unidade Curricular “Estágio”, sendo a sua realização uma das opções disponibilizadas pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior. Este estágio decorreu de 10 de abril de 2017 a 2 de junho do mesmo ano, na sede dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins, integrado na Unidade Local de Saúde da Guarda, localizada no piso -1 do referido hospital, na cidade da Guarda.

Embora invulgar, optou-se por estruturar o presente relatório de forma inovadora, sendo, no entanto, esta a forma encontrada pelo autor de melhor descrever e explicar a qualquer leitor não só o funcionamento destes SF, mas também mostrar, de forma lógica e sequencial os diversos passos do circuito do medicamento, aplicado ao âmbito particular da farmácia hospitalar. Tendo-se optado por uma estruturação semelhante à realizada para farmácia comunitária, crê o autor que esta é a melhor forma de descrever a experiência vivida.

Nesse sentido, começa-se por uma necessária descrição do espaço físico, equipamentos e demais particularidades dos SF. São referidos os recursos humanos, competências e responsabilidades dos colaboradores deste serviço, entre Farmacêuticos, técnicos e auxiliares.

Posteriormente é explicado o circuito do medicamento dentro da farmácia hospitalar, desde a seleção, com os particulares critérios requeridos e seriedade da gestão de dinheiro do erário público, passando pela aquisição, receção, arrumação, validação e envio para os respetivos serviços. De seguida, é descrito o papel do Farmacêutico na prestação de cuidados de saúde e a forma como este profissional está integrado em equipas polidisciplinares.

A experiência obtida permitiu conhecer e descrever o funcionamento geral dos SF, sendo esta da maior importância no percurso académico de qualquer estudante.

## 2. Organização e Estrutura dos Serviços Farmacêuticos

### 2.1. Espaço Físico e Equipamentos

Os Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins, estão localizados no piso -1 do Pavilhão Novo do Hospital Sousa Martins, sito na mesma cidade. A ULS da Guarda corresponde à

agregação do referido hospital, do Hospital Nossa Senhora da Assunção e 13 Centros de Saúde do distrito da Guarda. Os Serviços Farmacêuticos estão assim encarregues da distribuição e manutenção dos stocks de medicamentos, dispositivos médicos e outros produtos, nomeadamente produtos dietéticos, pensos, matérias primas, vacinas, antídotos e contraceptivos, sendo a prática regulada pelo Decreto-Lei nº 44204, e a dispensa de medicamentos realizada de acordo com o DL nº 206/2000, condições definidas no DL nº13/2009 e boas práticas instituídas pelo Ministério da Saúde e Ordem dos Farmacêuticos (111-115).

Dentro do serviço estão confinadas todas as instalações, armazéns e equipamentos necessários ao completo bom funcionamento dos serviços farmacêuticos. O acesso é feito por duas portas, protegidas com cartão de acesso, e ainda uma porta traseira, que fornece acesso direto ao cais de cargas e descargas exterior ao hospital, permitindo acesso facilitado de medicação, dispositivos e demais produtos aos armazéns dos SF.

Os SF estão dispostos ao longo de um comprido corredor central. Contam com um escritório para os serviços administrativos, um gabinete para a secretária do serviço, um gabinete para o responsável dos SF, um *open space* para os Farmacêuticos, laboratório de farmacotecnia, instalações sanitárias, sala de pausa/reuniões, sala de estagiários, sala de preparação dos circuitos de distribuição, armazém central, área de receção de encomendas, com ligação ao armazém central e ao exterior, armazém de inflamáveis (protegido com paredes reforçadas, drenagem de líquidos e porta reforçada de abertura para o interior), armazém de grandes volumes (soros e desinfetantes), zona de preparações estéreis (nomeadamente citotóxicos) e zona de desinfeção.

Da perspetiva de quem entra no serviço pela entrada oeste para o corredor geral, do lado esquerdo encontra o gabinete da secretária técnica, do responsável do serviço, o gabinete do secretariado, sala de pausas e de reuniões e instalações sanitárias e de limpeza. O gabinete de secretariado funciona em *open space*, e contém todos os equipamentos de comunicação necessários. Os Farmacêuticos dispõem de outro gabinete com o mesmo conceito, equipado com todo o equipamento necessário, nomeadamente telefones e computadores, armários e bibliografia, imediatamente anexo à sala de preparação dos circuitos de distribuição, onde se encontram os Técnicos de Farmácia e auxiliares de serviço.

A sala de preparação dos circuitos de distribuição conta com vários balcões, cada um destinado a um circuito específico. Nesta sala encontram-se diversos armários onde se encontra medicação em formato unidose, arrumada por ordem alfabética. Como será descrito adiante, todo e qualquer blister unidose está identificado com a DCI, dosagem e prazo de validade. A sala dispõe ainda de equipamento informático adequado ao trabalho a realizar.

Esta sala possui uma ligação direta lateral à zona de armazenamento, em particular ao armazém central. Neste encontram-se prateleiras onde os medicamentos são dispostos nas suas embalagens originais, por ordem alfabética. Estão presentes também frigoríficos e arcas congeladoras, onde se arrumam os artigos que necessitam de frio, nomeadamente vacinas, insulinas, plasma e outros hemoderivados. Alimentação parenteral, suplementos vitamínicos, alimentação entérica, pensos, pomadas e emplastros, entre outros, encontram-se também nesta sala. Anexa a esta encontra-se a zona de receção, com ligação direta ao exterior. Aqui encontram-se bancadas de trabalho, um frigorífico (para não quebrar a cadeia de frio para os produtos que o requeiram) e equipamento adequado à realização das tarefas designadas. No extremo do serviço encontra-se o armazém de produtos inflamáveis, com as características descritas e o armazém de grandes volumes.

Exterior à área de armazenamento, de frente para a sala de preparação dos circuitos de distribuição, encontra-se a sala dos estagiários, um gabinete de apoio ao trabalho realizado por aqueles que frequentam o serviço com o intuito de terminar a sua formação, tanto na área das Ciências Farmacêuticas como de Farmácia. À direita desta, da mesma perspetiva inicial, encontra-se a área de preparações estéreis, onde se faz a preparação de citostáticos. Este tipo de medicamentos é armazenado nesta sala. A mesma possui uma antecâmara que liga à sala de preparação propriamente dita, devidamente equipada (o equipamento presente será descrito adiante). O serviço conta ainda com uma sala de desinfeção, lateral a esta área, onde todos os equipamentos que entram no serviço são limpos e desinfetados.

## 2.2. Recursos Humanos

O bom funcionamento dos Serviços Farmacêuticos do Hospital Sousa Martins depende inteiramente da dedicada equipa de 22 colaboradores que dispõe. Os recursos humanos são a chave de sucesso em qualquer serviço. O responsável pelos SF é o Dr. Jorge Aperta, que tem a seu cargo todas as atividades de gestão, planeamento, e representação do serviço perante as autoridades administrativas do hospital. Este é o responsável pela organização e distribuição de funções pelos demais colaboradores. Os SF dispõem de 9 Farmacêuticos, dispostos por diversas áreas funcionais e serviços, 6 Técnicos de Farmácia, 4 administrativos e 4 auxiliares de serviço. O serviço inclui um chefe de divisão, que substitui o Dr. Jorge Aperta nos seus compromissos e impedimentos. Cada área funcional tem, como referido, um Farmacêutico responsável.

O Farmacêutico do setor de aquisições gere os stocks, realiza as encomendas, gera encomendas e notas de encomenda. É o responsável por supervisionar os consumos e realizar os orçamentos com base nos consumos previstos. Esta ação é fundamental para a boa gestão dos SF. A aquisição de medicamentos imprevistos ou fora do orçamentado inicialmente é

também sua responsabilidade, bem como medicamento que requeiram uma Autorização de Utilização Especial.

Os Farmacêuticos do setor da distribuição são os responsáveis pela validação da medicação distribuída por dose unitária. A cada um destes estão atribuídos diferentes serviços. A conferência da medicação preparada pela parte técnica é também responsabilidade destes Farmacêuticos. Estes devem monitorizar as concentrações séricas dos fármacos que o requeiram e assegurar que a terapêutica individualizada é a mais adequada. São os responsáveis pela medicação que sai das instalações dos SF.

Também para o setor da farmacotecnia e preparação de citotóxicos há um Farmacêutico responsável. Embora a primeira seja praticamente nula, fruto da industrialização da medicação, a segunda continua a ser uma fundamental parte do quotidiano do Farmacêutico, sendo necessário preparar este tipo de medicação praticamente todos os dias. Garantir as condições de preparação e manipulação de medicamentos, bem como assegurar a existência de protocolos e procedimentos bem definidos, controlo de qualidade e registo adequado são respeitantes ao Farmacêutico deste setor.

O setor técnico é responsável pela preparação da medicação individualizada e reposição por distribuição tradicional e por stocks nivelados. A arrumação da medicação no armazém geral e receção da mesma também são responsabilidades destes profissionais. São assistidos nas suas funções por assistentes operacionais, nomeadamente na distribuição da medicação pelos serviços.

### **3. Circuito do Medicamento em Farmácia Hospitalar**

#### **3.1. Seleção e Aquisição**

A seleção e aquisição de medicação é responsabilidade dos Farmacêuticos. No Hospital Sousa Martins há um profissional dedicado apenas a esta gestão. É primária responsabilidade deste Farmacêutico a adequada gestão de stocks, conhecimento dos medicamentos existentes e necessidades atuais, previsão de consumos, elaboração de pedidos de compra e notas de encomenda e autorização para aquisição de medicamentos passíveis de autorização especial. É fundamental garantir também o controlo dos prazos de validade e as condições de armazenamento dos vários medicamentos existentes. A atividade deste setor é regulada pela Portaria nº 155/2007 e pelo Despacho nº 16206/2013 (116,117).

A aquisição de medicação a nível hospitalar baseia-se em previsões de consumo. Existe um orçamento anual, revisto com a mesma periodicidade, cuja elaboração tem em vista os gastos relativos ao ano anterior, antevendo potenciais alterações. Este orçamento deverá ser elaborado mediante a análise do conjunto de patologias mais frequentes no Hospital Sousa

Martins, bem como uma avaliação dos doentes potenciais que irá tratar. Tenta-se que o orçamento seja o mais próximo possível da realidade e várias análises são feitas nesse sentido. Está estabelecido que se recorre a um sistema de análise denominado de TOP N, semelhante à análise ABC, que, de forma muito redutora, determina que apenas 20% das referências utilizadas no Hospital consomem 80% dos recursos financeiros. Este tipo de análise é fundamental para conhecer os produtos de maior rotação e com isto constituir estimativas mais fidedignas em termos daquilo que serão os gastos previstos. Apesar de ser um Hospital de pequena/média dimensão, o orçamento geral dos SF é superior a 8 milhões de euros. Uma adequada gestão do erário público é fundamental, sendo necessário um controlo apertado para garantir a execução do orçamentado. A cada fármaco é cabimentado um determinado valor a partir das análises referidas.

A compra propriamente dita é feita mediante acordo com os Serviços Partilhados do Ministério da Saúde, através de plataforma online. Os SPMS organizam os fármacos em grupos farmacoterapêuticos. Para cada fármaco, estão disponíveis um ou mais fornecedores, que foram aprovados pelo Ministério. Ainda assim, a compra tem de originar numa necessidade comprovada, e por isso tem de ser autorizada pelo Conselho de Administração do Hospital. Para cada aquisição é então aberto um concurso que pode ter uma ou mais posições. Cada fornecedor apresenta uma proposta para uma ou mais dessas posições. Dentro do concurso é o Hospital que define as regras. Por imposição legal, este apenas pode aplicar critérios de exclusão. Em função do catálogo do SPMS está definido um valor máximo unitário, que não pode ser ultrapassado. Após a entrega das propostas, o serviço responsável ordena os candidatos e atribui a posição a um dado fornecedor. O critério passa sobretudo pelo valor económico da transação. Após a publicação dos resultados, o fornecedor tem 5 dias para apresentar uma reclamação junto do serviço, que pode ser ou não deferida. A decisão final para a compra está sempre remetida para o Conselho de Administração.

A aquisição pode ser ainda realizada por ajuste direto, sendo que nesta situação não é necessário passar por um concurso público para dar início à aquisição. No entanto o valor máximo da transação não pode passar os 75000€. Todas as transações acima de 10000€ implicam a assinatura dum contrato vinculativo de prestação de serviços ou produtos entre o Hospital e o fornecedor. Contratos celebrados acima de 350000€ requerem aprovação prévia pelo Tribunal de Contas. Antes de ser executada uma encomenda é necessário obter uma folha de compromisso - uma garantia de execução do pagamento,

Com frequência são necessários medicamentos de Autorização de Utilização Excepcional. Estes são medicamentos que por vários motivos ainda não se encontram dentro do Formulário Hospitalar Nacional, seja por necessitarem ainda de aprovação ou por requererem ainda avaliação económica. Nestes casos, o clínico tem de requerer o fármaco em questão, tendo de ser o pedido remetido ao INFARMED e à Comissão de Farmácia e Terapêutica.

### 3.2. Receção

Os medicamentos e demais produtos, fornecidos por distribuidores e laboratórios, dão entrada através da área específica para o efeito, dispondo esta de uma porta de entrada direta para o exterior, que consta de um cais de cargas e descargas coberto. Por lei, a medicação é entregue com uma guia de remessa, onde se encontram discriminados todos os artigos da encomenda, devidamente identificados e quantificados. O ato de receção, embora não seja competência exclusiva e direta de Farmacêutico, envolve a conferência de todos os produtos recebidos, em concordância com a guia de remessa, que por sua vez corresponde à nota de encomenda realizada pelo Farmacêutico responsável pela aquisição. Todas as entradas têm de ser devidamente registadas e garantidas as adequadas condições de armazenamento. Na zona de receção encontra-se equipamento informático e vários balcões e mesas onde se dispõe a medicação. Dispõe também dum frigorífico, para armazenar os produtos que necessitem de frio, enquanto os mesmos não são trasladados para local respetivo. À zona de receção, como previamente referido, conflui o armazém central, o armazém de grandes volumes e o armazém de inflamáveis. Estas áreas dispõem de características adequadas que serão especificadas adiante. Toda a documentação resultante do ato de entrega deverá ser entregue aos serviços administrativos da farmácia.

### 3.3. Armazenamento

A medicação na farmácia hospitalar, pela dimensão e quantidade, é arrumada de forma muito diferente em comparação com a farmácia comunitária. De forma geral, é preciso garantir condições de armazenamento adequadas, garantindo uma temperatura máxima de 25°, humidade inferior a 60° e proteção da luz solar direta. Com efeito, nos SF da ULS da Guarda, o armazém central consiste numa sala isolada do frio e do calor, sem janelas para o exterior, dotada de equipamentos de refrigeração e aquecimento e com múltiplos sensores que garantem a manutenção das condições ideais. Neste armazém encontra-se uma série de prateleiras de grande dimensão, onde a medicação é arrumada por ordem alfabética de DCI, ainda que, sendo mantida nas embalagens originais, tenha um nome comercial diferente. Todo e qualquer medicamento aqui arrumado tem de estar devidamente identificado. Assim cada produto dispõe de uma etiqueta que marca o correto local de armazenamento, onde consta o nome comum, forma farmacêutica e dose. Esta etiqueta ainda contém informação sobre a dose da forma farmacêutica e sinais de alerta caso se trate de medicação perigosa. A escrita do princípio ativo tem em consideração as regras de nomenclatura *LASA*, *Look Alike* *Sound Alike*, as prateleiras verticais servem para a arrumação de medicação comum. Além destas, encontram-se prateleiras para produtos especiais, nomeadamente anticoncetivos, como pílulas, preservativos, dispositivos intrauterinos, anéis vaginais e outros, medicamentos de elevada rotação, i.e., medicamentos de uso recorrente, agilizando a sua procura e arrumação e ainda produtos dietéticos, como dietas entéricas e parenterais. Uma outra prateleira armazena todos os pensos, emplastos, apósitos e demais produtos de aplicação

tópica com cariz medicamentoso ou não. Encostados às paredes estão os diversos frigoríficos onde são armazenados produtos vários como vacinas, insulinas e outros. A temperatura definida encontra-se entre os 2° C e os 8° C, isento de condensação da humidade. Estes equipamentos dispõem de sensores adequados para monitorizar a temperatura e disparar alarmes em caso de falha. Encontra-se ainda uma arca frigorífica, com fecho de chave, onde se encontra armazenado o plasma a uma temperatura de -40° C, com controlo e registo de temperatura. Por fim, existem armários fechados com chave, para armazenamento de benzodiazepinas, um cofre de grandes dimensões onde se encontram os estupefacientes e um outro onde se encontra a medicação dos doentes com Hepatite C, pelo enorme custo associada a esta terapêutica.

No armazém de inflamáveis encontram-se os produtos que pelas características químicas sejam passíveis de possuir qualquer grau de perigosidade. É aqui que se arrumam também alguns desinfetantes de maior dimensão. Este armazém possui características particulares, nomeadamente um reforço estrutural e uma porta que apenas abre para o interior. Tem ainda um detetor de fumos e chuveiro de deflagração automática.

O armazém de grandes volumes ocupa uma sala de dimensão adequada ao transporte, manuseamento e armazenamento de grandes quantidades de embalagens individuais de soros de tipos diversos. De acordo com as boas práticas em vigor, existe espaço suficiente para o transporte de paletes.

O armazenamento de citotóxicos é feito em armário e frigorífico próprio, na área de preparação específica a este tipo de fármacos e segregada do circuito normal de manuseamento. Neste local existe um kit de emergência, que está colocado em local visível, Chemoprotect® Spill Box.

O armazenamento e condicionamento de medicamentos em farmácia hospitalar é definido pelo DL nº 75/2013 e pelo Despacho nº 10302/2009 (118,119).

### 3.4. Distribuição

Toda a medicação que circula na rede que constitui a ULS da Guarda, nomeadamente no Hospital Sousa Martins, Hospital Nossa Senhora da Assunção e nos 13 centros de saúde do distrito, parte dos Serviços Farmacêuticos de Hospital Sousa Martins. O circuito de distribuição dentro duma ULS é, portanto, muito mais abrangente do que seria dentro dum só hospital. A distribuição constitui assim a parte mais visível do trabalho do Farmacêutico dentro dum hospital. É este serviço que assegura que cada medicamento será entregue nas condições ideais a cada um dos doentes do hospital, através de diversas formas e metodologias.

A forma mais eficaz e segura de distribuir medicamentos, garantido adequadas condições de segurança de entregar a medicação é a distribuição diária individual em dose unitária, constituindo também esta a forma mais laboriosa e consumidora de tempo. No entanto, este sistema de distribuição não se mostra adequado para todos os serviços hospitalares, sendo necessário distinguir outros sistemas de distribuição que garantam que todos os serviços hospitalares têm a medicação necessária, seja para administração de urgência ou de rotina. Por esse motivo é necessária a distribuição de medicamentos pela via “tradicional”. Por outro lado, há medicação que, pelas suas características, apenas pode ser dispensada a nível hospital, a doentes externos. Tal constitui a distribuição em ambulatório, sendo incluída pelo autor neste segmento por representar uma das formas de saída de medicação dos SF.

Nos segmentos seguintes são discutidas as potenciais vantagens e desvantagens de cada sistema. Alguns destes sistemas tornam mínima a intervenção do Farmacêutico, sendo desaproveitado o potencial que este profissional de saúde pode ter dentro duma unidade de saúde.

A distribuição de medicamentos implica uma prescrição médica, embora não haja necessariamente uma validação da receita pelo Farmacêutico nalguns sistemas de distribuição, em meio hospitalar. Nestas situações a medicação prescrita é administrada pela parte de enfermagem, recorrendo aos stocks próprios. Atualmente, e há relativamente pouco tempo, a prescrição passou a ser inteiramente eletrónica, diminuindo os gastos com papel e facilitando a logística através da informatização. No entanto, verifica-se alguma diminuição da interação entre o clínico e o Farmacêutico, que antigamente se deslocava aos serviços para ir buscar a prescrição médica, na forma de *tickets*. Por outro lado, a informatização total da prescrição permite que os registos sejam vinculativos e inalteráveis, evitando problemas como a caligrafia difícil ou adulteração da prescrição. Deste modo, reduzem-se os erros com dosagem, nomeadamente a nível da dose, posologia, forma farmacêutica e outros.

#### 3.4.1. Tradicional/Clássica

A distribuição tradicional constitui a forma de distribuição em que a intervenção do Farmacêutico é praticamente inexistente. Nos serviços em que a dispensa por distribuição individual diária em dose unitária não seja viável, pela elevada rotação de doentes ou por apresentar necessidades especiais, sendo necessário manter um stock de medicação, recorre-se à distribuição tradicional. Os serviços de urgência ou pediatria são exemplos de serviços que recorrem a este sistema.

Na distribuição clássica, o serviço, geralmente na pessoa do enfermeiro-chefe, requisita aos SF uma quantidade definida de medicação e outros produtos, que considere serem suficientes

para as necessidades do serviço para um espaço de tempo definido, geralmente uma semana. Em caso de necessidade, poderão ser feitos pedidos extraordinários. O Farmacêutico procede à validação do pedido, verificando apenas se não existe alguma discrepância ou exagero relativamente ao normal, procedendo a parte técnica à preparação do pedido. Este deverá ser depois conferido na presença do Farmacêutico e remetido ao serviço requisitante.

Apesar da sua simplicidade, não há qualquer tipo de controlo sobre as quantidades enviadas relativamente às realmente utilizadas. Este aspeto não permite a rentabilização dos recursos escassos existentes, permitindo ou favorecendo o desperdício. A medicação e produtos enviados deverão seguir em dose unitária, seguindo as boas práticas estabelecidas, sempre que possível.

#### 3.4.2. Reposição por *stock* nivelado

A distribuição mediante reposição por *stock* nivelado constitui uma variante da distribuição tradicional. Mediante acordo entre os SF e o responsável pelo serviço, é definido um *stock* fixo para o mesmo, com base na previsão das necessidades específicas durante um período de tempo definido, geralmente uma semana. A cada semana verifica-se a quantidade existente a nível do serviço e o pedido reflete as necessidades de reposição até ao nível previamente estabelecido. Este sistema já implica um certo nível de controlo dos gastos por parte dos SF, sendo por isso preferível à distribuição tradicional. O Farmacêutico deverá analisar os *stocks* periodicamente, e avaliar a necessidade de alterações com base nos consumos. Antes de ser enviada ao serviço, a medicação a dispensar deverá ser conferida pelo Farmacêutico.

#### 3.4.3. Distribuição Individual Diária em Dose Unitária

Como referido, trata-se do mais eficaz e seguro sistema de distribuição de medicação em contexto hospitalar. Este sistema requer que a maioria da medicação esteja disponível em dose individual. O sistema de reembalamento existente no serviço permite colmatar os casos em que o fabricante não forneça já a medicação nesta forma, ou não forneça na dose desejada. Quando a medicação se encontra em blister individual, apenas é requerida a sua etiquetagem para garantir a correta identificação e rastreabilidade de todos os medicamentos. Em cada dose unitária, assim sendo, tem de constar o nome por DCI, a dose, a validade e o lote de medicação. Esta informação consta tanto nos blisters de reembalagem como nas etiquetas adicionadas a medicamentos que venham embalados individualmente de origem (blisters vulgares com várias unidades). A distribuição de medicamentos é feita para cobrir as necessidades de 24 horas de tratamento e deve estar individualizada por toma, idealmente. Os SF do Hospital Sousa Martins funcionam continuamente, no entanto, algumas das suas valências, como a preparação de medicação em dose unitária, não funcionam em

dias não úteis. Por esse motivo, nestes dias, a medicação tem de ser preparada antecipadamente.

Na distribuição individual diária em dose unitária, todo o circuito começa com a prescrição médica, que surge como uma alteração marcada a vermelho sobre o nome do doente, estando ordenados por serviço. Cada Farmacêutico tem a seu cargo vários serviços e é responsável pela validação da medicação dos mesmos. O Farmacêutico verifica a prescrição médica (ou as alterações na prescrição já existente), garantindo a não existência de duplicação da terapêutica, interações, posologias inadequadas ou quaisquer outros problemas relativos à terapêutica. Perante a existência de medicação com estreita margem terapêutica, ou cujo efeito seja concentração dependente, como a vancomicina ou gentamicina, cabe ao Farmacêutico tomar diligências para caracterizar os níveis sanguíneos e sugerir alterações com base nos dados obtidos. Em caso de dúvida ou deteção de problema, o clínico é contactado.

Seguindo um horário estabelecido, os armários de medicação individualizada são recolhidos dos serviços e levados até aos SF, onde são limpos e preparados, de acordo com horários previamente acordados. Após a validação e processamento da prescrição médica, por parte do Farmacêutico, os técnicos de farmácia podem começar a preparar a medicação. O sistema informático permite o registo automático de todas as prescrições e validações, permitindo o arquivo dos dados.

Após a preparação da medicação nos módulos de dose unitária, é necessário conferir toda a medicação. Apesar de a mesma ser preparada pela parte técnica, é responsabilidade do Farmacêutico, em última instância, garantir que todos os doentes a seu cargo recebem a medicação certa. Após a conferência da dose unitária, feita de forma cruzada (um Farmacêutico confere o serviço de outro colega), a medicação pode ser então entregue às enfermarias, onde todas as administrações são registadas no mesmo software que permite a validação e dispensa, ficando a informação disponível para os profissionais de saúde envolvidos.

A título de exceção refere-se o caso do serviço de cuidados intensivos, que pela particularidade da medicação que envolve, frequentemente recorrendo a perfusão sanguínea, dietas parentéricas entre outros aspetos, utiliza um sistema diferente, sendo o pedido enviado via eletrónica, impresso na hora e validado pelo Farmacêutico responsável, sendo transcritos para formulários próprios que são depois entregues à parte técnica, para a sua preparação. Os demais procedimentos são inalterados.

#### 3.4.4. Distribuição e Controlo de Benzodiazepinas, Psicotrópicos e Hemoderivados

A distribuição destes fármacos segue um percurso completamente diferente. Sendo fármacos que requerem um controlo e atenção especiais, a sua dispensa está a cargo de um Farmacêutico apenas. Assim, e apesar de muitos doentes terem benzodiazepinas ou psicotrópicos prescritos, independentemente do serviço onde se encontram, a validação não inclui estes fármacos, nem estes são distribuídos em formato unidose a cada doente.

A distribuição de benzodiazepinas, psicotrópicos e hemoderivados não recorre a programa informático integrado como os demais, utilizando-se um registo manual em formulário específico para controlar e registar as saídas destes.

Em função das necessidades e dos consumos habituais, é dispensada a cada serviço uma quantidade específica de um determinado fármaco do grupo das benzodiazepinas e psicotrópicos. Para isso, o enfermeiro chefe requisita aos SF a dispensa de uma quantidade definida de um dado medicamento, para cada dose e forma farmacêutica específica. O Farmacêutico responsável prepara então um formulário duplo, autocopiativo, onde se regista o serviço, a quantidade e identifica-se o medicamento em questão, indicando a DCI e a dose. Neste formulário, cujo original é mantido na farmácia e a cópia é entregue ao enfermeiro em questão, é obrigatório registar todas as administrações desse mesmo medicamento, sendo que quando a quantidade dispensada foi toda administrada o formulário é devolvido à farmácia para conferência. Toda a administração carece, obviamente, de prescrição médica. A medicação deste tipo, tal como nos SF, é armazenada de forma segregada da restante a nível dos diversos serviços, em armário fechado.

O caso dos medicamentos hemoderivados, um grupo muito específico de fármacos, definido como “proteínas plasmáticas de interesse terapêutico que não se podem sintetizar por métodos convencionais” (120). São considerados essenciais quatro hemoderivados, nomeadamente a albumina humana, imunoglobulinas poliespecíficas e os fatores de coagulação VIII e IX. A dispensa de hemoderivados segue um circuito separado, pelas suas características e vicissitudes. Em primeiro lugar, é obrigatório um registo de entrada específico, onde são identificados os lotes de fabricos e armazenados os certificados de análise, fornecidos pelo INFARMED. Todos os medicamentos considerados hemoderivados passam pelo crivo da autoridade do medicamento. Os registos de análise são armazenados por um período de 50 anos, dada a origem biológica destes fármacos. É necessário o preenchimento dum formulário específico, sendo obrigatória a identificação do doente, com todos os dados referentes a este, a justificação clínica e médico prescriptor. A administração e quantidades dispensadas são alvo de registo. O formulário é autocopiativo e uma das vias fica armazenada na farmácia e a outra é entregue ao serviço requisitante.

### 3.4.5. Ambulatório

Os SF não têm apenas a função de gerir e dispensar a medicação dentro do hospital. A dispensa de medicamentos a doentes externos, em regime de ambulatório surge por diversos motivos, nomeadamente a gestão de terapêutica com margem terapêutica estreita, seriedade ou cronicidade da patologia envolvida. Nestas situações o papel do Farmacêutico é de extrema importância, complementando o clínico. Esta dispensa está prevista no caso de algumas patologias particulares, descritas abaixo, terapêuticas tóxicas, de elevado valor financeiro ou ainda em comprovada quebra do medicamento em questão no mercado farmacêutico normal, estando prevista a dispensa em caso de emergência, sendo esta uma situação infrequente e de último recurso.

De acordo com as boas práticas vigentes, o Farmacêutico é responsável pela distribuição e controlo da medicação ao doente externos, sendo necessário elaborar um registo de perfil farmacoterapêutico para esse efeito. Estão disponíveis procedimentos e protocolos de dispensa da medicação necessária.

No Hospital Sousa Martins, existe uma área de ligação direta ao exterior com um balcão de atendimento direto. Por esta zona chegam os utentes para a dispensa, mas também os diversos pedidos de levantamento para os vários serviços do hospital. Apesar deste Hospital ter sido construído de raiz, esta área não corresponde ao recomendado pelo INFARMED nem pela Ordem dos Farmacêuticos. Pela possibilidade de alguma da medicação dispensada servir para o tratamento de doenças que acarretem algum estigma social, a dispensa seria feita idealmente em condições que permitam a confidencialidade, algo que não se verifica nestas instalações. As condições habituais de luminosidade, temperatura e humidade estão garantidas. Está disponível um equipamento informático com bases de dados científicas e registos dos utentes, incluindo, quando possível, a medicação dispensada, diagnósticos, clínico prescriptor e reações adversas.

A maioria da medicação dispensada a nível hospitalar é gratuita, havendo legislação específica nesse sentido. Medicamentos como os fatores anti-hemofílicos, antineoplásicos, tuberculoestáticos, antilepróticos, hormonas de crescimentos, medicamentos para fibrose quística, lúpus, hemofilia, hemoglobinopatias, antivirais para o VIH, eritropoietina, octreotido, medicamentos para doentes com paramiloidose e outros são de distribuição gratuita, ou tendencialmente gratuita, e simultaneamente são medicamentos que requerem um controlo especial. A dispensa gratuita da medicação para estas patologias está dependente da inclusão do medicamento em questão na listagem anual publicada em Diário da República.

Aquando da dispensa propriamente dita, o Farmacêutico tem como obrigação a promoção do uso responsável e correto da medicação prescrita, garantindo que o doente se encontra

munido de toda a informação relativa ao uso do medicamento, nomeadamente a posologia, via de administração e expectáveis efeitos secundários. Para isso é fundamental o Farmacêutico dispor de fontes de informação credenciadas e fidedignas que permitam assegurar a qualidade da informação transmitida ao doente. A função educativa do Farmacêutico é de primordial importância. Estão previstas *guidelines* que enumeram os dados relativos à medicação que os doentes devem conhecer. Na prática, a informação verbal é fundamental, devendo ser reforçada, sempre que possível, com informação escrita. O Farmacêutico deve assim assegurar que o utente deixa as instalações na posse de toda a informação para efetuar a sua terapêutica de forma responsável e cuidada.

Ao doente é pedida a apresentação da receita médica, de acordo com o disposto no Despacho nº 13382/2012, e apenas após o Farmacêutico verificar todos os dados necessários, nomeadamente um cartão fornecido pelo mesmo na primeira dispensa, entrega-se a medicação necessária. Este cartão permite a dispensa a pessoas que não o utente, frequente em caso de doentes acamados ou inválidos, sendo necessária a identificação completa do indivíduo que levanta a medicação. Na primeira dispensa é assinado também um termo de responsabilidade, de forma a garantir uma dispensa responsável de medicação. Geralmente, os doentes servidos na dispensa em ambulatório são doentes que estiveram internados no Hospital Sousa Martins ou seguidos em consultas de especialidade, sendo referenciados pelo médico de família. Como exceção, podemos distinguir os medicamentos biológicos, que podem ser prescritos por médicos que não os do Hospital (121).

Em virtude de o doente ser visto por médico geralmente apenas de meio em meio ano, a receita para dispensa em farmácia hospitalar tem de indicar a data da consulta em que foi feita a prescrição e também a data da próxima consulta. Assim sendo, a dispensa até à próxima consulta é feita recorrendo sempre à mesma receita, de forma mensal, por imposição da legislação em vigor, para evitar desperdício e mau uso. Na receita será escrita no verso a data de cada dispensa.

Alguma da medicação dispensada em farmácia hospitalar não é legislada, sendo necessária autorização por parte da direção clínica do Hospital e com o conhecimento da Comissão de Farmácia e Terapêutica. Toda a medicação está incluída no Formulário de Medicação Hospitalar. Se for necessário pode-se elaborar uma adenda ao Formulário. Trimestralmente é elaborado um relatório da medicação sujeita a Autorização Excepcional de Utilização, que é dispensada nos SF.

Relativamente à dispensa de produtos de nutrição, verificou-se num passado recente um consumo e dispensa excessiva destes, implicando um gasto significativo para os SF. Assim sendo, a CFT interveio no sentido de criar critérios diferenciadores para a dispensa deste tipo de produtos. Assim sendo, é necessária uma aprovação do médico prescriptor, bem como uma

avaliação pelo gabinete de nutrição do hospital e ainda um parecer do assistente social em conforme o utente não tem capacidade económica para suportar os custos associados a este tipo de produtos, que se encontram à venda no contexto de farmácia comunitária.

## **4. Preparação e Controlo de Produtos Farmacêuticos**

### **4.1. Generalidades**

Apesar de a manipulação de medicação propriamente dita ser, hoje em dia, praticamente depreciável, tanto em farmácia hospitalar como em farmácia comunitária, é necessário ter disponível um espaço adequado para a referida manipulação e todo o equipamento fundamental de laboratório. Geralmente as preparações efetuadas são realizadas para utilização para um doente ou situação específica, podendo haver preparações realizadas com antecedência para doentes potenciais. Todas as manipulações são realizadas tendo em mente o sistema de gestão de qualidade estabelecido, que implica a atribuição de responsabilidades, procedimentos, protocolos e recursos necessários ao bom funcionamento do serviço. Este sistema aplica-se a vários tipos de atividades. À área de preparações estéreis está atribuído um Farmacêutico com competências exclusivas e bem definidas pela direção do serviço. Deve ser garantida a formação contínua do profissional desta área. Em cada local de preparação ou manipulação de medicamentos encontram-se *guidelines* e registos adequados.

A preparação e manipulação de medicamentos está regida por uma série de cuidados especiais, pela natureza a que se destinam. Nesse sentido os profissionais que operam neste campo devem zelar e manter a limpeza e higiene dos locais de trabalho e comunicar qualquer problema de saúde, particularmente de foro infeccioso, que possa resultar em contaminação. Salvo situações excecionais, não deve ser permitida a entrada a pessoas estranhas ao serviço, sendo a zona de preparações estéreis, nomeadamente de citotóxicos, de entrada proibida. Estas medidas vão também no sentido de proteger também o Farmacêutico responsável, pelo potencial perigo de manuseamento de alguma medicação. De acordo com as boas práticas estabelecidas, também o pessoal responsável pela manutenção e limpeza deve receber formação adequada.

De forma geral, as áreas que envolvem a preparação de medicação requerem cuidados especiais, nomeadamente um apertado controlo das condições de higiene, humidade e temperatura. Todo o equipamento a utilizar deverá ser desinfetado com regularidade ou mantido em condições de assepsia. Existem instruções sobre a limpeza e manutenção dos equipamentos, estando as mesmas colocadas em local visível.

As matérias primas devem ser provenientes de laboratórios certificados e idealmente seriam analisadas nas instalações dos SF. No entanto, os SF do Hospital Sousa Martins não dispõem de laboratório de análise próprio. Um registo adequado dos certificados de análises fornecidos

pelos fabricantes e distribuidores deve ser mantido, em virtude de poder ser necessário rastrear qualquer lote de matéria prima. As matérias primas deverão ser mantidas em condições ideais, segregadas dos restantes medicamentos. O material de acondicionamento primário do medicamento manipulado/produto farmacêutico deve ser sujeito ao mesmo tipo de controlo da matéria prima. Todo e qualquer produto farmacêutico contém um rótulo que deverá conter toda a informação necessária, devendo permitir o rastreamento do produto produzido, validade, identificação do preparador e outros dados importantes.

## 4.2. Preparação de Citotóxicos

A preparação de citotóxicos é um dos processos farmacêuticos mais importantes no quotidiano dos SF do Hospital Sousa Martins. Aqui, um Farmacêutico tem atribuídas todas as responsabilidades que envolvem a preparação, manipulação e suporte de registos relacionados com estes fármacos. O elevado rigor e controlo necessários associado a estas preparações leva a que sejam necessárias medidas excecionais.

Isto leva a que toda e qualquer operação realizada no âmbito da preparação de citotóxicos, seja, em primeiro lugar, devidamente documentada e protocolada. Nas instalações próprias para o efeito, já descritas em secção anterior, encontramos todos os arquivos para o efeito. Os procedimentos de limpeza, manutenção, preparação e utilização dos equipamentos encontram-se em lugares bem identificados e devem ser atualizados com frequência. A sala onde se preparam os citotóxicos em si está dotada dos equipamentos necessários, tendo as características técnicas adequadas. A câmara de fluxo laminar e todos os equipamentos aqui disponíveis devem ser limpos em primeiro lugar, antes de qualquer preparação, por um técnico devidamente preparado para o efeito, com equipamento de proteção individual. O equipamento é assim limpo com etanol de 70°, devendo começar do mais limpo para o mais sujo e limpando em sentido descendente, ou seja, das superfícies superiores para as inferiores. O controlo ambiental nesta sala é elevado, sendo necessários registos constantes de temperatura, humidade e pressão. Semanalmente é realizado um controlo microbiológico, sendo inoculadas placas de cultura para análise posterior em laboratório adequado. Para garantir a proteção do preparador e do doente são mantidos registos de tempo de permanência dentro da sala de preparação e registos de exposição aos citotóxicos. Também são registados os lotes de todos os medicamentos preparados e materiais utilizados. Todos os registos são mantidos durante 5 anos.

Embora alguns citotóxicos sejam estáveis durante um período relativamente grande de tempo, estes são preparados para administração diária, quase imediata. Assim sendo, ao cabo de cada semana, os serviços de enfermagem enviam para os SF uma listagem com os doentes que se deslocarão ao Hospital Sousa Martins para receber tratamento quimioterapêutico na semana seguinte. Nesta tabela encontram-se dados como a superfície corporal, peso, altura e

o diagnóstico clínico do doente. Este hospital dedica-se a tratar essencialmente neoplasias de três áreas: aparelho digestivo, respiratório e urinário. Neoplasias de outros tipos podem ser tratadas neste hospital, mas os seus doentes são geralmente seguidos noutros locais.

Ainda assim, o Farmacêutico não inicia a preparação usando os dados desta tabela diretamente. Os doentes começam o dia sendo atendidos pelo seu médico assistente. São realizadas várias análises para compreender como se encontra o estado de saúde geral do doente. Apenas depois de ser dada aprovação por parte do médico é que se inicia a preparação do ciclo de quimioterapia. Geralmente não é administrado o ciclo de quimioterapia caso o doente se apresente com uma infeção ativa ou apresente uma contagem de linfócitos ou eritrócitos demasiado baixa. Nestes casos é frequentemente recomendada a administração de eritropoietina ou um fator de crescimento de granulócitos. Os clínicos seguem um conjunto de protocolos para o tratamento de patologia neoplásica que seguem as recomendações internacionais, nomeadamente pelo NCCN, *National Comprehensive Cancer Network*. Durante o espaço da manhã o Farmacêutico prepara as guias de preparação, rótulos e outros documentos necessários para poder dar início à manipulação de citotóxicos assim que autorizado pelo médico.

A preparação do ciclo de quimioterapia é realizada com a maior atenção às condições ambientais para a garantia e controlo de qualidade. Todo o material que entra na câmara é devidamente esterilizado. Deverão ser seguidas as *guidelines* na utilização da câmara de fluxo de ar laminar. O Farmacêutico trabalha em colaboração com um técnico de diagnóstico e terapêutica. Todos os preparados têm de ser verificados e validados pelo Farmacêutico antes de serem libertados para administração. Por motivos de segurança e controlo, apenas foi possível observar a preparação de citotóxicos através da janela designada para o efeito.

### 4.3. Farmacotecnia

A farmacotecnia, embora uma área fundamental da prática farmacêutica, é hoje uma parte quase insignificante da rotina farmacêutica. Assim sendo, e embora a existência dum laboratório devidamente equipado continue a ser obrigatória, conforme já descrito anteriormente. Atualmente as operações farmacêuticas reduzem-se à preparação de alguns xaropes e soluções, embalagem de pós em papéis, descongelamento de plasma e outros pequenos procedimentos.

Ainda assim, o controlo e garantia de qualidade continuam a ser fulcrais. Todos os procedimentos estão dependentes duma guia de preparação, estando todos os registos devidamente arquivados. As preparações efetuadas deverão ser rotuladas com lote, formulação, preparador, prazo de validade e outros dados relevantes. Tudo é passível de ser registado, para garantir a segurança tanto do preparador como do doente. Está estabelecido

um sistema de gestão da qualidade. As matérias primas e os equipamentos e materiais utilizados são sujeitos ao mesmo controlo, sendo necessário manter registos de análise e garantir que as matérias primas utilizadas são de laboratórios e fornecedores de confiança.

Na preparação deve-se ter em consideração todo o tipo de cuidados para evitar a contaminação dos preparados. Para o efeito devem estar especificados nos protocolos a utilizar o tipo de precauções a ter em conta, fazendo isto parte do controlo de qualidade. As zonas de trabalho devem estar delimitadas e todo o material devidamente identificado. Antes de qualquer preparação deve ser criada uma guia de preparação e um rótulo. A preparação deve ser confirmada, verificada e validada.

#### **4.4. Reembalagem em Dose Unitária**

A reembalagem de medicação é considerada um processo farmacêutico, estando sujeita ao mesmo tipo de controlo e cuidado das demais preparações, nomeadamente no que diz respeito à limpeza e manutenção do equipamento utilizado, embora seja responsabilidade da parte técnica. No Hospital Sousa Martins existe uma sala especificamente para reembalagem, onde se encontra equipamento próprio para o efeito e suporte informático. A medicação sujeita ao processo de reembalagem é armazenada em unidose, em blister plástico, sendo que cada dose unitária tem de incluir a DCI, dose, lote e validade de forma obrigatória. Além disto, é sempre necessária uma ficha de registo de reembalagem para permitir a rastreabilidade das operações. Estes esforços permitem evitar misturas e contaminações cruzadas. A medicação que vem de fábrica em blister individual não requer qualquer tipo de reprocessamento, sendo, no entanto, obrigatória a identificação individual de cada medicamento, motivo pelo qual a cada blister individual é colada uma etiqueta com a DCI, dose, lote e validade do medicamento. Apesar de a reembalagem ser uma competência da parte técnica, como referido, ao Farmacêutico compete definir a medicação que pode ser reembalada e fragmentada, atentando que nem todas as formas farmacêuticas ou substâncias ativas são passíveis de ser reembaladas. Todas estas operações são de validação obrigatória por parte do Farmacêutico, como parte integrante do controlo de qualidade.

### **5. Participação do Farmacêutico no Acompanhamento Clínico**

#### **5.1. Visita Médica**

Cada um dos Farmacêuticos tem, como referido, vários serviços a seu cargo. Sempre que possível, o Farmacêutico acompanha a visita médica semanal, estreitando relações com os demais profissionais de saúde, nomeadamente médicos e enfermeiros. A visita médica permite ao Farmacêutico o esclarecimento de dúvidas respeitantes à terapêutica prescrita e relativas ao diagnóstico clínico. Por outro lado, permite que os demais profissionais de saúde

possam esclarecer as suas dúvidas junto do Farmacêutico. Esta aproximação tem a vista a interdisciplinaridade e a promoção da saúde do utente.

## 5.2. Farmacovigilância

O Farmacêutico, enquanto responsável máximo pelo medicamento, tem também a função de monitorizar e reconhecer reações adversas ao uso de medicação. Este profissional tem, portanto, o dever de atentar a quaisquer problemas que surjam durante o uso de terapêutica medicamentosa. A farmacovigilância corresponde ao estudo, identificação e monitorização de reações adversas associadas a terapia medicamentosa. A identificação precoce de reações adversas permite evitar problemas em maior escala.

Existe um sistema integrado de gestão de farmacovigilância, gerido pelo INFARMED, sendo idealmente reportadas todas as reações adversas independentemente da sua gravidade. O controle permite caracterizar o contexto em que surgem as reações adversas, nomeadamente os fatores que podem afetar a etiologia da reação.

A notificação faz-se através do preenchimento da Ficha de Notificação de Reações Adversas, pelo profissional de saúde e tem de incluir dados como o doente, a reação adversa suspeita, a terapêutica habitual, dados relevantes do historial, fármaco suspeito de desencadear a reação e identificação do notificante. Este documento deve ser submetido num prazo não superior a 15 dias à autoridade competente (122-125). Atualmente o procedimento é realizado via eletrónica.

## 5.3. Participação em Comissões Técnicas do Hospital

O Farmacêutico, enquanto responsável máximo pelo medicamento, é incluído em várias das comissões técnicas hospitalares, sendo o seu *input* valorizado pela qualidade e rigor científico da informação que presta. Assim sendo a presença do Farmacêutico é obrigatória por Lei na Comissão de Farmácia e Terapêutica, na Comissão de Ética e no grupo de coordenação do Programa de Prevenção e Controlo de Infeção e Resistência Antimicrobiana (PPCIRA), sendo a presença do Farmacêutico neste grupo opcional.

A Comissão de Farmácia e Terapêutica, regulada pelo Despacho nº 1083/2004, estabelece que a CFT atua como “órgão de ligação entre os serviços de ação médica e os serviços farmacêuticos”. A CFT tem a obrigação de garantir o cumprimento do formulário hospitalar nacional do medicamento, analisar a relação custo medicamento, pronunciar-se sobre a medicação prescrita aos doentes, quando requerido, monitorizar a prescrição médica e propor alterações sobre as matérias pertinentes. A delineação de estratégias para o controlo de custos, que têm aumentado consideravelmente, leva a que a avaliação e seleção de

medicamentos a adquirir tenha de ser feita da forma mais criteriosa possível. O Farmacêutico desempenha um papel fulcral nesta comissão (126,127).

À Comissão de Ética, como definido no Decreto-Lei 97/95, compete zelar pela “observância de padrões de ética no exercício das ciências médicas”. O intuito será sempre proteger e garantir a dignidade da vida humana. Esta comissão tem uma composição polidisciplinar, estando um Farmacêutico integrado na mesma. Esta comissão rege-se por um regulamento interno criado pela mesma. Como funções tem a regulação e autorização para a realização de ensaios clínicos, promover os princípios gerais da bioética, reconhecer e validar a pertinência de novos tratamentos e abordagens terapêuticas, entre outras (128).

#### 5.4. Cuidado Farmacêutico

O trabalho dum Farmacêutico dentro dum Hospital não se resume apenas à validação de medicação prescrita e subsequentemente dispensada. Como definido nas boas práticas a “identificação, prevenção e resolução” de problemas existentes ou potenciais relacionados com a terapêutica faz parte do papel integrado do Farmacêutico na promoção da saúde. O primordial objetivo será sempre a melhoria da qualidade de vida do doente. Este deverá ser, portanto, o principal objeto da atenção do profissional, e não apenas a prestação dum serviço de forma robotizada.

Perante um doente, o Farmacêutico começa por aceder aos dados disponíveis sobre este, para determinar a existência de problemas relacionados com a terapêutica. Para esse fim é necessário conhecer quais os objetivos terapêuticos especificamente para o doente em questão, com o propósito de propor alternativas. Dando a conhecer toda a informação ao doente, o Farmacêutico pode sugerir alterações no esquema terapêutico, devendo contactar o médico sempre que considere importante. Uma avaliação do trabalho realizado é sempre necessária, para determinar o impacto na vida do doente. A manutenção dum sistema de indicadores de qualidade é fundamental em qualquer serviço.

O conceito de cuidado farmacêutico remete também para a atenção que o Farmacêutico presta na hora da validação, um trabalho de fundamental importância para a promoção da qualidade de vida e saúde do doente, mas não raras vezes esquecido ou relegado para segundo plano.

## 5.5. Prestação de Informação Relativa a Medicamentos

A elevada complexidade anexa à farmacologia, bem como a crescente quantidade de doentes polimedicados leva a que cada vez mais o Farmacêutico seja um profissional crucial em equipas de saúde multidisciplinares. Todos os dias surgem novos medicamentos, descobrem-se novas reações adversas e interações farmacológicas relevantes. Disponibilizar informação cientificamente correta e atualizada ao médico prescriptor é fundamental para a promoção da saúde do doente. Ao Farmacêutico acresce, portanto, uma função pedagógica. Quando confrontado com as dúvidas de utentes e/ou clínicos este profissional mostra-se sempre disponível para auxiliar em quaisquer questões levantadas.

Os conhecimentos transmitidos pelos Farmacêuticos devem ser sempre fundamentados com bases de dados credíveis e fontes de informação científica reconhecidas. O objetivo, conforme definido nas boas práticas, será “promover o uso seguro, eficaz e económico de medicamentos, dispositivos médicos” e outros produtos de foro farmacêutico. O Farmacêutico deverá garantir que acompanha os mais recentes desenvolvimentos da área técnica da Farmacologia e Terapêutica, sendo esta uma função adicional de todos os profissionais dos SF do Hospital Sousa Martins. Verifica-se que diariamente é recebida informação, por via eletrónica ou postal, reportando os mais recentes desenvolvimentos e descobertas na área da terapêutica. Esta é, portanto, uma área do conhecimento em constante mutação e desenvolvimento, sendo necessária a máxima atenção para seguir os progressos. Nas instalações dos SF são mantidos vários livros e fontes de informação creditadas para consulta interna. A nível nacional existem várias estruturas capazes de auxiliar o Farmacêutico Hospitalar no esclarecimento de dúvidas.

## 6. Conclusão

A realização do estágio terminado a 2 de junho de 2017, permitiu ao autor conhecer e compreender um contexto completamente diferente daquele encontrado numa sala de aula. De forma prática e realista, o estágio permite um contacto presencial com as questões levantadas no exercício de farmácia hospitalar.

O autor agradece à equipa dos Serviços Farmacêuticos, na pessoa do Dr. Jorge Aperta, pela disponibilidade demonstrada para transmitir os seus conhecimentos. Apesar das dificuldades acrescidas em realizar um estágio mais, o esforço foi reconhecidamente valioso.

# Bibliografia

1. Barbosa M. Fundão. Cerejeiras nunca interessaram a tantos investidores, até estrangeiros [Internet]. 2016 [citado 3 de Agosto de 2017]. Disponível em: <https://www.dinheirovivo.pt/fazedores/galeria/fundao-cerejeiras-nunca-interessaram-a-tantos-investidores-ate-estrangeiros/>
2. Food and Agriculture Organization. Sweet Cherry World Production Data [Internet]. 2017 [citado 13 de Agosto de 2017]. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/>
3. Hayaloglu AA, Demir N. Physicochemical Characteristics, Antioxidant Activity, Organic Acid and Sugar Contents of 12 Sweet Cherry ( *Prunus Avium* L.) Cultivars Grown in Turkey. *J Food Sci.* 2015;80(3):C564-70.
4. Gonçalves B, Silva AP, Moutinho-Pereira J, Bacelar E, Rosa E, Meyer AS. Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 2007;103(3):976-84.
5. Serra AT, Duarte RO, Bronze MR, Duarte CMM. Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chem.* 2011;125(2):318-25.
6. Bastos C, Barros L, Dueñas M, Calhella RC, Queiroz MJRP, Santos-Buelga C, et al. Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chem.* 2015;173:1045-53.
7. Usenik V, Fabčič J, Štampar F. Sugars, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 2008;107(1):185-92.
8. Kelebek H, Selli S. Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *Int J Food Sci Technol.* 2011;46(12):2530-7.
9. Ballistreri G, Continella A, Gentile A, Amenta M, Fabroni S, Rapisarda P. Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chem.* 2013;140(4):630-8.
10. McCune LM, Kubota C, Stendell-Hollis NR, Thomson C a. Cherries and Health: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010;51(1):1-12.
11. Li A-N, Li S, Zhang Y-J, Xu X-R, Chen Y-M, Li H-B. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients.* 2014;6(12):6020-47.
12. Jerónimo Catalão MB. Caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades antimicrobianas de cerejas do Fundão. Universidade da Beira Interior; 2016.
13. Silva G. O efeito dos extractos de cereja em células humanas do cancro da próstata: Do cultivo à clínica? Universidade da Beira Interior; 2016.
14. Serrano M, Guillén F, Martínez-Romero D, Castillo S, Valero D. Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *J Agric Food Chem.* 2005;53(7):2741-5.
15. Vermerris W, Nicholson RL. Phenolic Compound Biochemistry. 2008;151-90.

16. Crozier A, Del Rio D, Clifford MN. Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Mol Aspects Med.* 2010;31(6):446-67.
17. McDougall GJ, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system. *J Agric Food Chem.* 2005;53(15):5896-904.
18. Grigoras CG, Destandau E, Zubrzycki S, Elfakir C. Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method. *Sep Purif Technol.* 2012;100:51-8.
19. Lin JY, Tang CY. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chem.* 2006;101(1):140-7.
20. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MS V, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits - an overview. Vol. 47, *International Journal of Food Science and Technology.* 2012. p. 2023-44.
21. Silveira Henriques I. Quantificação de melatonina em cinco variedades de cereja da Cova da Beira. Universidade da Beira Interior; 2015.
22. Giada M. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. *Oxidative Stress Chronic Degener Dis - A Role Antioxidants.* 2013;87-112.
23. Harborne JB, Simmonds NW. *Biochemistry of Phenolic Compounds.* London: Academic Press; 1964. 101 p.
24. Bravo L. Polyphenols : Chemistry , Dietary Sources , Metabolism , and Nutritional Significance. *Nutr Rev.* 1998;56(11):317-33.
25. Del Rio D, Costa LG, Lean MEJ, Crozier A. Polyphenols and health: What compounds are involved? *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010;20(1):1-6.
26. Mozetič B, Trebše P. Identification of sweet cherry anthocyanins and hydroxycinnamic acids using HPLC coupled with DAD and MS detector. *Acta Chim Slov.* 2004;51(1 SPEC. ISS.):151-8.
27. Ieri F, Pinelli P, Romani A. Simultaneous determination of anthocyanins, coumarins and phenolic acids in fruits, kernels and liqueur of *Prunus mahaleb* L. *Food Chem.* 2012;135(4):2157-62.
28. Selleckchem. Rutin at Selleckchem [Internet]. [citado 14 de Agosto de 2017]. Disponível em: [http://www.selleckchem.com/products/Rutin\(Rutoside\).html](http://www.selleckchem.com/products/Rutin(Rutoside).html)
29. Garcia-salas P, Morales-soto A, Segura-carretero A, Fernández-gutiérrez A. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules.* 2010;8813-26.
30. Antolovich M, Prenzler P, Robards K, Ryan D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst.* 2000;125(5):989-1009.
31. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2(12):1231-46.
32. Naczki M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A.*

- 2004;1054(1-2):95-111.
33. Shim S. Changes in Profiling of Phenolic Compounds , Antioxidative Effect and Total Phenolic Content in Smilax China Under in Vitro Physiological Condition. 2012;36:748-55.
  34. de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JG. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. *J Agric Food Chem.* 2000;48(11):5331-7.
  35. Vikram DS, Rivera BK, Kuppusamy P. Free Radicals and Antioxidant Protocols. *Free Radicals Antioxid Protoc.* 2010;610(2):3-27.
  36. Escarpa a, González MC. Optimization strategy and validation of one chromatographic method as approach to determine the phenolic compounds from different sources. *J Chromatogr A.* 2000;897(1-2):161-70.
  37. Heaney R. Bioavailability of Nutrients and Other Bioactive Components from Dietary Supplements. *J Nutr.* 2001;131(4):1376-82.
  38. Carbonell-Capella JM, Buniowska M, Barba FJ, Esteve MJ, Frígola A. Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2014;13(2):155-71.
  39. Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundam Clinical Pharmacol.* 1999;13(2):154-68.
  40. Stoner CL, Cleton A, Johnson K, Oh D-M, Hallak H, Brodfuehrer J, et al. Integrated oral bioavailability projection using in vitro screening data as a selection tool in drug discovery. *Int J Pharm.* 2004;269:241-9.
  41. Ferrec E, Chesne C, Artusson P, Brayden D, Fabre G, Gires P, et al. In Vitro Models of the Intestinal Barrier. *Altern to Lab Anim.* 2001;29:649-68.
  42. Devkar ST, Lin J, Tam YK, Katyare SS. Evaluation of the bioavailability of major withanolides of *Withania somnifera* using an in vitro absorption model system. *J Adv Pharm Technol Res.* 2015;
  43. Saura-Calixto F, Serrano J, Goñi I. Intake and bioaccessibility of total polyphenols in a whole diet. *Food Chem.* 2007;101(2):492-501.
  44. Dupas C, Baglieri AM, Ordonaud C, Tomè D, Maillard MN. Chlorogenic acid is poorly absorbed, independently of the food matrix: A Caco-2 cells and rat chronic absorption study. *Mol Nutr Food Res.* 2006;50(11):1053-60.
  45. Artursson P. Epithelial transport of drugs in cell culture. I: A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive (Caco-2) cells. *J Pharm Sci.* 1990;79(6):476-82.
  46. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* 2006;22(1):186-98.
  47. Versantvoort CHM, Oomen AG, Van De Kamp E, Rompelberg CJM, Sips AJAM. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem Toxicol.* 2005;43(1):31-40.

48. Seiquer I, Rueda A, Olalla M, Cabrera-Vique C. Assessing the bioavailability of polyphenols and antioxidant properties of extra virgin argan oil by simulated digestion and Caco-2 cell assays. Comparative study with extra virgin olive oil. *Food Chem.* 2015;188:496-503.
49. Gil-Izquierdo A, Zafrilla P, Tomás-Barberán F a. An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract. *Eur Food Res Technol.* 2002;214(2):155-9.
50. Tomás-Barberán F a, Gil MI, Cremin P, Waterhouse a L, Hess-Pierce B, Kader a a. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J Agric Food Chem.* 2001;49(10):4748-60.
51. Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct Food Funct.* 2014;5(5):1113-24.
52. Bermudez-Soto M, Tomás-Barberán F, García-Conesa M. Stability of polyphenols in chokeberry (*Aronia melanocarpa*) subjected to in vitro gastric and pancreatic digestion. *Food Chem.* 2007;102(3):865-74.
53. Kamiloglu S, Capanoglu E, Grootaert C, van Camp J. Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells???A review. *Int J Mol Sci.* 2015;16(9):21555-74.
54. Kalt W, Liu Y, McDonald JE, Vinqvist-Tymchuk MR, Fillmore SAE. Anthocyanin metabolites are abundant and persistent in human urine. *J Agric Food Chem.* 2014;62(18):3926-34.
55. Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, Van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr.* 1 de Outubro de 1981;34(10):2248-56.
56. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A, Zucco F. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: Influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol.* 2005;21(1):1-26.
57. Borchardt RT. Hidalgo, I. J., Raub, T. J., and Borchardt, R. T.: Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability, *Gastroenterology*, 96, 736-749, 1989—The Backstory. *Am Assoc Pharm Sci J.* 2011;13(3):323-7.
58. Yamashita S, Konishi K, Yamazaki Y, Taki Y, Sakane T, Sezaki H, et al. New and better protocols for a short-term Caco-2 cell culture system. *J Pharm Sci.* 2002;91(3):669-79.
59. Natoli M, Leoni BD, D'Agnano I, Zucco F, Felsani A. Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol Vitr.* 2012;26(8):1243-6.
60. Hartung T, Balls M, Bardouille C, Blanck O, Coecke S, Gstraunthaler G, et al. Good Cell Culture Practice. ECVAM Good Cell Culture Practice Task Force Report 1. *Altern to Lab Anim.* 2002;30(4):407-14.
61. Quaroni A, Hochman J. Development of intestinal cell culture models for drug

- transport and metabolism studies. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;22(1-2):3-52.
62. Peng Y, Yadava P, Heikkinen AT, Parrott N, Railkar A. Applications of a 7-day Caco-2 cell model in drug discovery and development. *Eur J Pharm Sci.* 2014;56(1):120-30.
  63. Cai Y, Xu C, Chen P, Hu J, Hu R, Huang M, et al. Development, validation, and application of a novel 7-day Caco-2 cell culture system. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2014;70(2):175-81.
  64. ATCC. Passage Number Effects In Cell Lines. *Tech Bull.* 2010;7:1-4.
  65. Bouayed J, Hoffmann L, Bohn T. Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake. *Food Chem.* 2011;128(1):14-21.
  66. Fazzari M, Fukumoto L, Mazza G, Livrea M a, Tesoriere L, Marco L Di. In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium L.*). *J Agric Food Chem.* 2008;56(10):3561-8.
  67. Yamashita S, Furubayashi T, Kataoka M, Sakane T, Sezaki H, Tokuda H. Optimized conditions for prediction of intestinal drug permeability using Caco-2 cells. *Eur J Pharm Sci.* 2000;10(3):195-204.
  68. Geraghty RJ, Capes-Davis a, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 2014;111(August):1-26.
  69. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology.* 1989;96(3):736-49.
  70. Hur SJ, Lim BO, Decker EA, McClements DJ. In vitro human digestion models for food applications. *Food Chem.* 2011;125(1):1-12.
  71. Tarko T, Duda-chodak A, Zajac N. Digestion and absorption of phenolic compounds assessed by in vitro methods. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2013;64(2):79-84.
  72. Rompelberg CJM, Versantvoort CHM, Van De Kamp E. Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. Vol. 320102. 2004.
  73. Etienne-mesmin L, Denis S. Relevance and challenges in modeling human gastric and small intestinal digestion(review,2012).pdf. *Trends Biotechnol.* 2012;30(11):591-600.
  74. Chen GL, Hu K, Zhong NJ, Guo J, Gong YS, Deng XT, et al. Antioxidant capacities and total polyphenol content of nine commercially available tea juices measured by an in vitro digestion model. *Eur Food Res Technol.* 2013;236(2):303-10.
  75. Hur SJ, Decker EA, McClements DJ. Influence of initial emulsifier type on microstructural changes occurring in emulsified lipids during in vitro digestion. *Food Chem.* 2009;114(1):253-62.
  76. Tagliacruzchi D, Verzelloni E, Bertolini D, Conte A. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. *Food Chem.* 2010;120(2):599-606.
  77. Bird IM. High performance liquid chromatography: principles and clinical applications.

- BMJ. 1989;299(6702):783-7.
78. Günzler H, Williams A. Handbook of Analytical Techniques. Vols. 1-2. 2008. 1-1182 p.
  79. P. W. Scott R. Principles and Practice of Chromatography. Vol. 1, Complementary Therapies in Medicine. Library For Science; 1993. 108-109 p.
  80. Veronika R. M. Practical High-Performance Liquid Chromatography. 4th ed. Wiley; 2004.
  81. Artursson P, Palm K, Luthmanb K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical drug transport predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;46(96):27-43.
  82. Zgórká G, Kawka S. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. *J Pharm Biomed Anal.* 2001;24(5-6):1065-72.
  83. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. US Dep Heal Hum Serv. 2001;(May):4-10.
  84. González-Gómez D, Lozano M, Fernández-León MF, Bernalte MJ, Ayuso MC, Rodríguez AB. Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *J Food Compos Anal.* 2010;23(6):533-9.
  85. Talavéra S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):3902-8.
  86. Ordem dos Farmacêuticos. Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF). Vol. 3ª Edição. 2009. 53 p.
  87. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de Agosto Regime jurídico das farmácias de oficina. *Diário da República.* 2007;1-35.
  88. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 171/2012. *Diário da República.* 2012;1-30.
  89. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 156/2005. *Diário da República* 2005 p. 5580-5.
  90. Assembleia da República. Portaria n.º 896/2008. *Diário da República* 2008 p. 5672-8.
  91. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 176/2006 «Estatuto do Medicamento». *Diário da República* 2006 p. 1-250.
  92. INFARMED. Projeto Via Verde do Medicamento. *Circ Inf N° 019/CD/10020200.* 2015;4-5.
  93. Administração Central do Sistema de Saúde. Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde. 2014;1-37.
  94. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 48-A/2010. *Diário da República* 2010 p. 2-15.
  95. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 106-A/2010. *Diário da República* 2010.
  96. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 103/2013. *Diário da República.* 2013;
  97. Assembleia da República. Constituição da República Portuguesa. *Diário da República.* 1976;91.
  98. Assembleia da República. Lei n.º 56/79. *Diário da República.* 2013;1-61.
  99. Assembleia da República. Portaria n.º 287/2016. *Diário da República* 2017 p. 4017.

100. Instituto da Segurança Social. Guia Prático - Fundo Especial de Segurança Social do Pessoal da Indústria de Lanifícios. 1-11 p.
101. Assembleia da República. Deliberação n.º 292/2005. Diário da República 2005 p. 2005.
102. Assembleia da República. Portaria n.º 154/2013. Diário da República 2013 p. 2-6.
103. Assembleia da República. Lei n.º 77/2014. Diário da República 2014 p. 28-9.
104. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 15/93. Diário da República 1991 p. 234-52.
105. Assembleia da República. Despacho n.º 17690/2007. Diário da República. 2007;10-2.
106. Assembleia da República. Deliberação n.º 24/CD/2014. Diário da República. 2014;
107. Grenha CM, Azevedo Antão A. Sustentabilidade da dispensa de medicamentos nas farmácias em Portugal. 2016.
108. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 145/2009. Diário da República 2009.
109. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 95/2004. Diário da República 2004 p. 2004-7.
110. Assembleia da República. Deliberação n.º 1500/2004. Diário da República 2004 p. 1-2.
111. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 44 204, de 2 de Fevereiro de 1962. Diário da República. 1962;
112. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 206/2000, de 1 de Setembro. Diário da República 2000 p. 23-4.
113. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 13/2009, de 12 de Janeiro. Diário da República 2009 p. 12-3.
114. Ordem dos Farmacêuticos. Manual Boas Práticas de Farmácia Hospital da Ordem dos Farmacêuticos. 2-67 p.
115. Brou MHL, Feio JAL, Mesquita E, Ribeiro RMPF, Brito MCM, Cravo C, et al. Manual da Farmácia Hospitalar. Ministério da Saúde; 2005. 69 p.
116. Assembleia da República. Portaria n.º 155/2007, de 31 de Janeiro. Diário da República 2007 p. 10-1.
117. Assembleia da República. Despacho n.º 16206/2013. Diário da República 2013 p. 13-5.
118. Assembleia da República. Despacho n.º 10302/2009, de 13 de Abril. Diário da República. 2009;6-7.
119. Assembleia da República. Decreto-Lei n.º 75/2013, de 4 de junho. Diário da República. 2013;
120. Braga F. Medicamentos Derivados do Plasma Humano. Rev da Ordem dos Farm. 2013;107:1-2.
121. Assembleia da República. Despacho n.º 13382/2012, de 4 de outubro. Diário da República 2012 p. 2-3.
122. European Medicines Agency. European Medicines Agency policy on publication of clinical data for medicinal products for human use. EMA/759287/2009 Revis. 2014;44(October).
123. Assembleia da República. Lei n.º 51/2014. Diário da República. 2007;d.
124. European Medicines Agency. Risk minimisation strategy for high-strength and fixed-combination insulin products Addendum to the good practice guide on risk

- minimisation and prevention of. EMA/686009/2014. 2015;44(October).
125. European Medicines Agency. Good practice guide on risk minimisation and prevention of medication errors. EMA/606103/2014 Pharmacovigil Risk Assess Comm. 2015;44(April):1-36.
  126. Assembleia da República. Despacho n.º 1083/2004, de 1 de Dezembro de 2003. Diário da República 2004 p. 2003-4.
  127. Costa FA da. O papel das Comissões de Farmácia e Terapêutica. Rev da Ordem dos Farm. 2008;84:36-40.
  128. Assembleia da República. Decreto Lei n.º 97/95. Diário da República.

# Anexos

O presente trabalho foi submetido para apresentação no Congresso Nacional dos Farmacêuticos, que se celebrará nos dias 12 a 14 de outubro de 2017 no Centro de Congressos de Lisboa:

*Determination of phenolic compounds in Prunus avium L.: comparison of six sweet cherry cultivars from Fundão, Portugal*

R. Ramos<sup>1</sup>; A.P Duarte<sup>1</sup>; E. Gallardo<sup>1</sup>

*Phenolic Compounds are Bioaccessible from Prunus avium L. extract after a simulated in vitro digestion*

R. Ramos<sup>1</sup>; E. Gallardo<sup>1</sup>; A.P. Duarte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), Covilhã, Portugal.

## 1. Anexo ao Capítulo I, II. Parte Experimental, 3.2.1. Seletividade

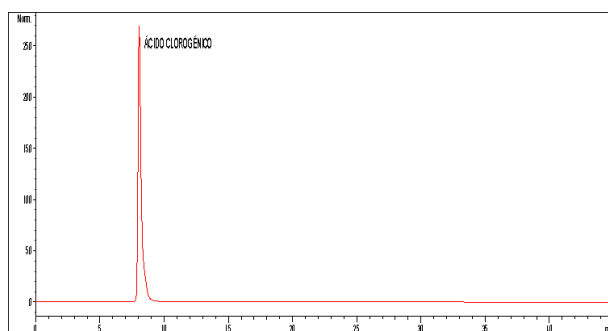


Figura 6: cromatograma obtido para o padrão ácido clorogénico.  $\lambda=320$  nm, TR=8,05 min.



Figura 7: cromatograma obtido para o padrão ácido gálico.  $\lambda=280$  nm, TR=2,96 min.

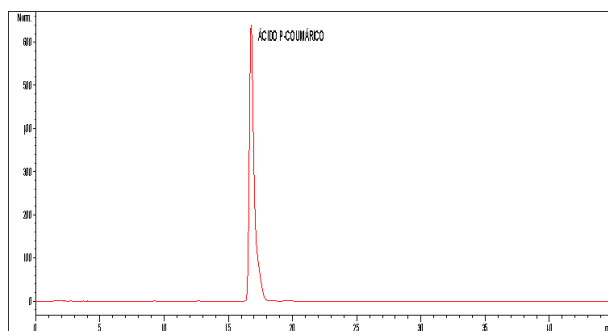


Figura 8: cromatograma obtido para o padrão ácido p-coumárico.  $\lambda=320$  nm, TR=16,77 min.

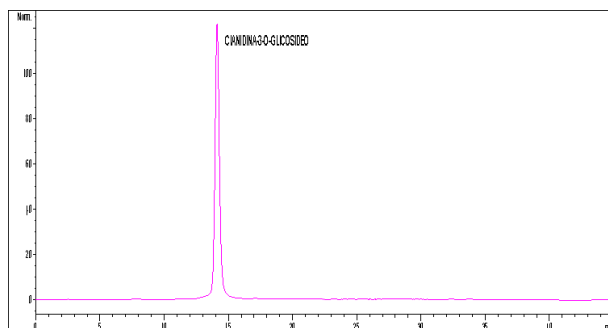


Figura 9: cromatograma obtido para o padrão cianidina-3-O-glicosídeo.  $\lambda=520$  nm, TR=14,12 min.

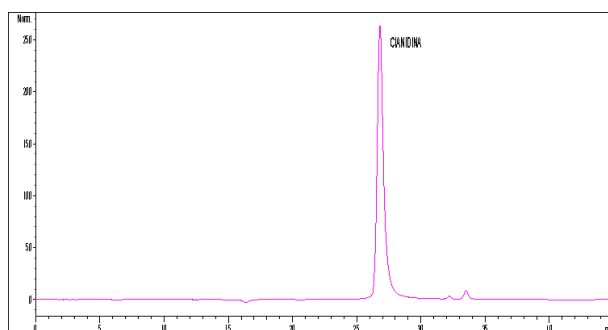


Figura 10: cromatograma obtido para o padrão cianidina.  $\lambda=520$  nm, TR=26,81 min.

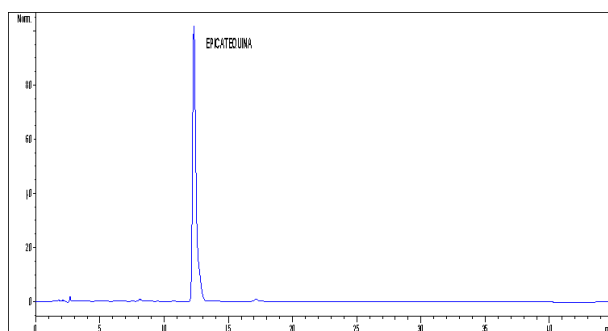


Figura 11: cromatograma obtido para o padrão epicatequina.  $\lambda=280$  nm, TR=12,31 min.

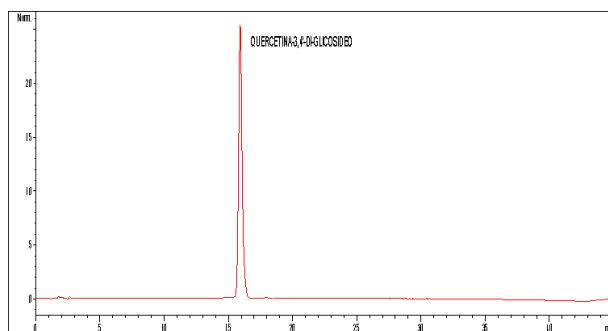


Figura 12: cromatograma obtido para o padrão quercetina-3-4'-di-O-glicosídeo.  $\lambda=520$  nm, TR=15,92 min.

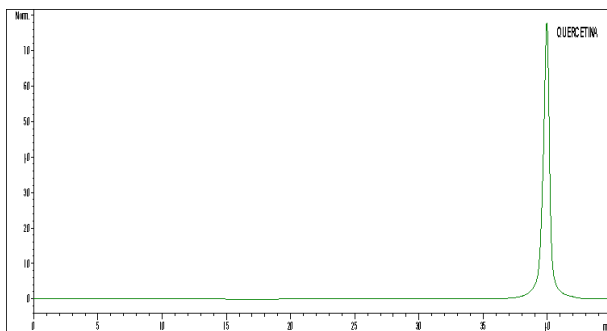


Figura 13: cromatograma obtido para o padrão quercetina.  $\lambda=360$  nm, TR=39,96 min.

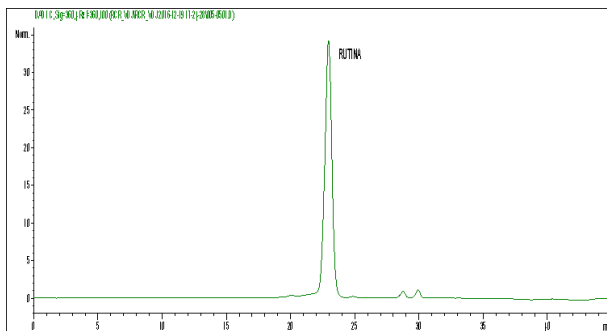


Figura 14: cromatograma obtido para o padrão rutina.  $\lambda=360$  nm, TR=22,95 min.

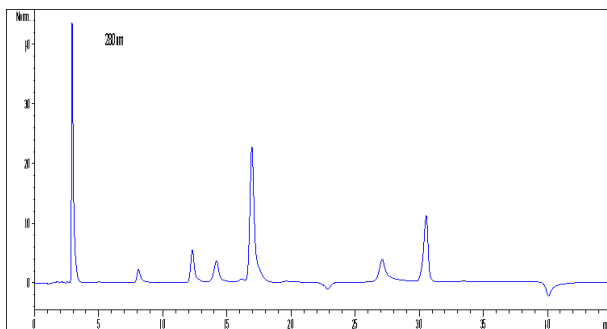


Figura 15: cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  $\lambda=280$  nm.

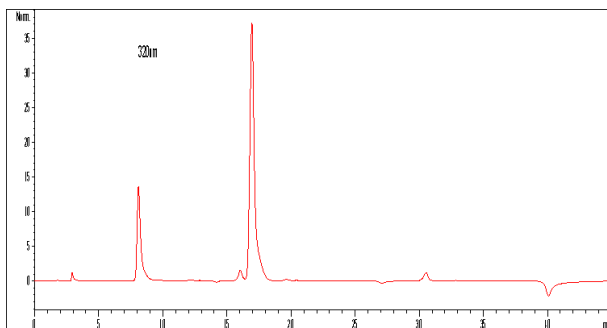


Figura 16: cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  $\lambda=320$  nm.

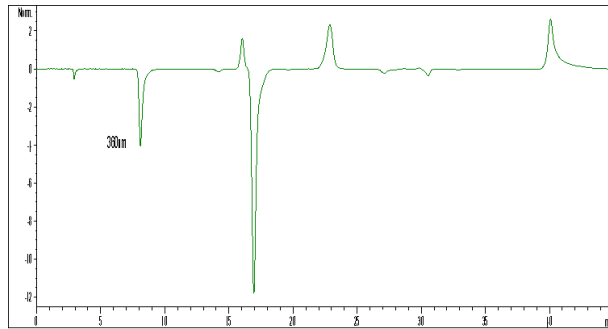


Figura 17: cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  
 $\lambda=360$  nm.

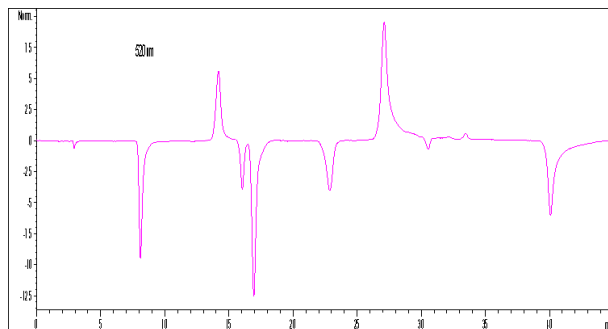


Figura 18: cromatograma obtido da injeção de solução mãe (0,1 mg/mL) contendo todos os padrões.  
 $\lambda=520$  nm.