



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Síntese de derivados da estrona funcionalizados nos anéis C e D como potenciais agentes anti-cancerígenos

**Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia
Comunitária e Investigação**

Patrícia Sofia Cabral Pires

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Ciclo de estudos integrado)

Orientador: Professor Doutor Samuel Silvestre
Co-orientador: Mestre Catarina Canário

Covilhã, junho de 2016

*“Happiness can be found
even in the darkest of
times, if one only
remembers to turn on
the light”*

J. K. Rowling

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo o apoio e carinho. Não há palavras que consigam descrever a minha sorte em os ter.

Aos meus amigos, aos de cá e aos de lá, aos que estão longe e aos que estão perto, por existirem na minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, aqueles que por que lá passaram, e os que ainda hoje partilham comigo a luta que é a vida de investigador, pelo conhecimento partilhado e ajuda mútua.

E ao meu orientador, Professor Samuel Silvestre, e à minha co-orientadora, Catarina Canário, por me guiarem neste caminho sinuoso que é a química orgânica.

A todos vós.

Obrigado.

Resumo

Na presente dissertação é apresentada informação relativa à experiência adquirida no estágio curricular em farmácia comunitária, assim como ao trabalho de investigação experimental efetuado paralelamente.

O estágio em farmácia comunitária, realizado maioritariamente na farmácia *Holon* Covilhã, permitiu-me efetuar tarefas e adquirir conhecimentos no âmbito das várias áreas de intervenção farmacêutica: aprovisionamento, atendimento, gestão de documentação, gestão de qualidade e ações perto da comunidade. Permitiu-me não só perceber um pouco melhor qual a extensão do contributo do farmacêutico para a saúde pública, como também adquirir e aprofundar o meu conhecimento das ciências farmacêuticas.

A investigação experimental, levada a cabo no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, incidiu sobre o desenvolvimento e a avaliação biológica de derivados da molécula de estrona funcionalizados nos anéis C e D com potencial atividade anti-tumoral. Com este objetivo, foram sintetizadas algumas moléculas e efetuou-se a avaliação da sua atividade anti-proliferativa em várias linhas celulares humanas. Os resultados desta avaliação biológica parecem demonstrar que o derivado com a substituição 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi tem elevada ação anti-proliferativa nas várias linhas celulares estudadas. Adicionalmente, a introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 levou também a um marcado efeito anti-proliferativo, principalmente em células HepaRG. Esta modificação estrutural, bem como a introdução de uma lactona no anel D, têm potencial interesse, uma vez que têm sido associadas a uma redução da estrogénicidade, o que poderá ser benéfico na seletividade da sua ação. São necessários, no entanto, estudos mais aprofundados para confirmação e melhoria dos resultados obtidos.

Palavras-chave

Farmácia comunitária, intervenção farmacêutica, investigação experimental, derivados da estrona, atividade anti-tumoral.

Abstract

In the current thesis I present information concerning the experience I've obtained during my community pharmacy internship, as well as the experimental investigation work that took place in parallel.

The community pharmacy internship, held mainly at *Holon Covilhã* pharmacy, allowed me to execute tasks and obtain knowledge in the many areas of the pharmaceutical practice: provisioning, dispensing/counselling, documentation management, quality management and actions taken near the community. It allowed me not only to better understand the extension of the pharmacist's contribution to the public health, but also to acquire and deepen my knowledge of the pharmaceutical sciences.

The experimental investigation, that took place at the Health Sciences Investigation Centre at University of Beira Interior, fell upon the development and biological evaluation of functionalized C and D-ring derivatives of the estrone molecule with potential antitumor activity. With this purpose, several molecules were synthesized and their antiproliferative activity in human cell lines was also assessed. The results of this biological evaluation seem to show that the 11 β -nitroxy-9 α -hydroxy derivative gives rise to a high antiproliferative action in the several cell lines that were included in this study. Moreover, the insertion of a double bond between carbon atoms 9 and 11 also led to a considerable antiproliferative effect, especially in HepaRG cells. This structural modification, as well as the formation of a D ring lactone, have potential interest, since they both have been associated with the reduction of the molecule's estrogenicity, which may be beneficial in what concerns action selectivity. However, in order to confirm the veracity and improve these results, it is necessary to further investigate the matters at hand.

Keywords

Community pharmacy, pharmaceutical practice, experimental investigation, estrone derivatives, antitumor activity.

Índice

Agradecimentos	v
Resumo	vii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xix
Lista de Acrónimos.....	xxi
Capítulo 1: Relatório de estágio em Farmácia Comunitária.....	1
1. Introdução	1
1.1. As farmácias <i>Holon</i>	1
2. Documentação	2
3. Pessoal e espaço físico	3
4. A atividade farmacêutica	4
5. Aprovisionamento	5
6. Gestão e controlo de qualidade.....	7
7. Atendimento.....	12
8. Serviços	20
8.1. Consulta farmacêutica e PIM.....	21
8.2. <i>Check-saúde</i>	24
8.3. Nutrição	25
8.4. Pé diabético e podologia	26
8.5. Dermofarmácia	28
8.6. Intervenções comunitárias	32
9. Formação contínua.....	36
10. Apreciação global do período de estágio	38

Capítulo 2 - Síntese de derivados da estrona funcionalizados nos anéis C e D como potenciais agentes anti-cancerígenos	39
1. Introdução	39
1.1. Esteroides: generalidades e biossíntese endógena	39
1.2. Cancro: o porquê da necessidade de novas terapias	45
1.3. Modificações nos anéis C e D da estrona com potencial interesse anti-tumoral	47
2. Objetivos.....	51
3. Parte experimental	52
3.1. Síntese química	52
3.1.1. Materiais e equipamentos	52
3.1.2. Reagentes e solventes	52
3.1.3. Sínteses químicas.....	53
3.1.3.1. Síntese de acetato de estrona	53
3.1.3.2. Hidrólise do acetato de estrona	54
3.1.3.2.1. Hidrólise utilizando KOH.....	54
3.1.3.2.2. Hidrólise utilizando K_2CO_3	55
3.1.3.3. Nitro-oxidação do acetato de estrona	56
3.1.3.4. Tentativas de hidrólise do acetato de 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo	57
3.1.3.4.1. Hidrólise utilizando metanol e KOH	57
3.1.3.4.2. Hidrólise utilizando piridina e NaOH	58
3.1.3.5. Síntese de de acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)	59
trien-3-ilo.....	59
3.1.3.5.1. Reacção de Baeyer-Villiger utilizando MMPP	59
3.1.3.5.2. Reacção de Baeyer-Villiger com ácido benzenoselenínico e H_2O_2	60
3.1.3.6. Tentativas de hidrólise do acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)	61
trien -3-ilo.....	61
3.1.3.6.1. Hidrólise utilizando KOH.....	61
3.1.3.6.2. Hidrólise utilizando K_2CO_3	62
3.1.3.7. Síntese de acetato de 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5 (10)-trien-3-ilo	63

3.1.3.8. Tentativa de síntese de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo	64
3.1.3.9. Síntese de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona	65
3.1.3.10. Síntese de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo	66
3.1.3.11. Tentativa de oxidação alílica do acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetra en-3-ilo.....	67
3.1.3.12. Tentativa de síntese de acetato de 17a-oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10),9(11) - tetraen-3-ilo	68
3.2. Avaliação biológica	69
3.2.1. Materiais e equipamentos.....	69
3.2.2. Reagentes e solventes	70
3.2.3. Protocolo experimental para avaliação da proliferação celular	70
3.2.3.1. Cultura celular	70
3.2.3.2. Tripsinização e sementeira	71
3.2.3.3. Incubação das células com os compostos.....	72
3.2.3.4. Ensaio MTT	73
3.2.4. Estatística	74
4. Resultados e discussão.....	74
4.1. Síntese química.....	74
4.1.1. Esquema sintético	74
4.1.2. Interpretação de resultados	75
4.2. Avaliação biológica	82
5. Conclusões	85
6. Perspetivas futuras.....	85
7. Referências	87

Lista de Figuras

Figura 1 - A atividade farmacêutica em farmácia comunitária	5
Figura 2 - Fluxo de informação pretendido entre os profissionais da farmácia.....	7
Figura 3 - Modelo PDCA	8
Figura 4 - Progressão geral do atendimento numa farmácia <i>Holon</i>	13
Figura 5 - Parte interior e exterior de uma <i>pill-box</i>	24
Figura 6 - Esqueleto estrutural geral de moléculas esteroides	39
Figura 7 - Síntese de hormonas esteroides nas glândulas adrenais e gónadas	40
Figura 8 - Conversão da molécula de colesterol em pregnenolona e isocaproaldeído pelo CYP11A.....	40
Figura 9 - Conversão das moléculas de pregnenolona e progesterona em, respetivamente, DHEA e acetaldeído, e androstenodiona e acetaldeído pelo CYP17	41
Figura 10 - Conversão da molécula de androstenodiona em estrona e ácido fórmico pelo CYP19	41
Figura 11 - Conversão das moléculas de pregnenolona e DHEA em, respetivamente, progesterona e androstenodiona pela 3 β HSD	42
Figura 12 - Ação das várias isoenzimas da 17 β HSD	43
Figura 13 - Estruturas químicas dos derivados do acetato de estrona 11 β -nitrado e 11 β -metoxi	48
Figura 14 - Estrutura química base de derivados da estrona nitro-oxidados	49
Figura 15 - Estrutura química da molécula de estrolactona-3-metilo	50
Figura 16 - Estrutura química da molécula de D-homoestrona	50
Figura 17 - Procedimento experimental geral dos ensaios de proliferação celular efetuados.	70
Figura 18 - Representação esquemática de metade de uma caixa <i>multiwells</i> para o ensaio da proliferação celular a 30 μ M	73
Figura 19 - Esquema reacional total da síntese orgânica efetuada	74
Figura 20 - Esquema reacional da possível isomerização ocorrida	78
Figura 21 - Espectro 1 H RMN completo da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona	79

Figura 22 - Ampliação do espectro ^1H RMN da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona	80
Figura 23 - Espectro ^1H RMN completo da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona com lactona no anel D	81
Figura 24 - Pormenor do espectro ^1H RMN da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona com lactona no anel D	82
Figura 25 - Gráfico de percentagem de proliferação celular relativa obtida a $30\ \mu\text{M}$ para cada um dos compostos testados, nas linhas celulares onde foram testados todos.....	83
Figura 26 - Gráfico de percentagem de viabilidade celular relativa obtida a $30\ \mu\text{M}$ para os compostos que foram testados em todas as linhas celulares	84
Figura 27 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de estrona produzida a partir da reação de acetilação	88
Figura 28 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) da molécula de acetato de estrona produzida a partir da reação de acetilação	88
Figura 29 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de acetato de estrona produzida a partir da reação de acetilação	88
Figura 30 - Espectro ^1H RMN (DMSO, 400 MHz) da molécula de estrona produzida a partir das reações de hidrólise.....	88
Figura 31 - Espectro ^{13}C RMN (DMSO, 100 MHz) da molécula de estrona produzida a partir das reações de hidrólise.....	88
Figura 32 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de estrona produzida a partir das reações de hidrólise	88
Figura 33 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 9α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo produzida a partir da reação com CAN	88
Figura 34 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) molécula de acetato de 9α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo produzida a partir da reação com CAN	88
Figura 35 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de acetato de 9α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo produzida a partir da reação com CAN.....	88
Figura 36 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo produzida a partir da reação de Baeyer-Villiger.	88
Figura 37 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo produzida a partir da reação de Baeyer-Villiger.	88
Figura 38 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 9α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)tetraeno-3-ilo produzida a partir da reação com CAN.....	88

Figura 39 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona produzida a partir da reação com DDQ.....	88
Figura 40 - Espectro ^{13}C RMN (DMSO, 100 MHz) da molécula de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona produzida a partir da reação com DDQ.....	88
Figura 41 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona produzida a partir da reação com DDQ.	88
Figura 42 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo produzida a partir da reação de acetilação.	88
Figura 43 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) da molécula de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo produzida a partir da reação de acetilação.	88

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Cores de etiquetagem e significados correspondentes	9
Tabela 2 - Resumo das condições a que foram submetidas as várias linhas celulares aquando da cultura para crescimento.....	71

Lista de Acrónimos

3BHSD	3B-Hidroxiesteroide desidrogenase
17BHSD	17B-Hidroxiesteroide desidrogenase
AB	Estreptomicina, penicilina e anfotericina B
AI	Inibidor da aromatase
AINE	Anti inflamatório não esteroide
ANF	Associação nacional de farmácias
Caco-2	<i>Colorectal adenocarcinoma cells</i>
CAN	Nitrato de amónio e cério
CCF	Cromatografia em camada fina
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CV	Cardiovascular
CYP11A	Citocromo P450 subtipo 11A
CYP17	Citocromo P450 subtipo 17
CYP19	Citocromo P450 subtipo 19, ou aromatase
CYP450	Citocromo P450
δ	Desvio químico
Δ	Dupla ligação entre átomos de carbono, C=C
d (¹ H RMN)	Dubleto
dd (¹ H RMN)	Duplo dubleto
DDQ	2,3-Dicloro-5,6-diciano- <i>p</i> -benzoquinona
DGS	Direção geral de saúde
DHEA	Desidroepiandrosterona
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crónica
DVC	Doença vascular crónica
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro fetal bovino
FEV1	<i>Forced expiratory volume</i> (vol. total de expiração forçada)
FVC	<i>Forced vital capacity</i> (vol. expiratório máximo num segundo)
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
HOAc	Ácido acético
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% da população celular
IV	Infravermelho

l (reagentes)	Estado líquido
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
m (¹ H RMN)	Multiplete
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MeOH	Metanol
MMPP	Monoperoxiftalato de magnésio hexahidratado
MNSRM	Medicamento não sujeito a receita médica
MSRM	Medicamento sujeito a receita médica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
NAPDH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PDCA	<i>Plan, do, check, act</i>
PIM	Preparação individualizada da medicação
PSA	Antigénio específico da próstata
PSOF	Pesquisa de sangue oculto nas fezes
RCU	Recetor citosólico uterino
Rf	Fator de retenção
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de protões
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s (reagentes)	Estado sólido
s (¹ H RMN)	Singuleto
SCORE	<i>Systematic coronary risk evaluation</i>
SERM	Modulador seletivo de recetor de estrogénio
SGPS	Sociedade gestora de participações sociais
SGQ	Sistema de gestão de qualidade
SNS	Sistema nacional de saúde
SP	Estreptomicina e penicilina
t (¹ H RMN)	Triplete
TGI	Trato gastrointestinal
THF	Tetrahidrofurano
TSN	Terapia de substituição de nicotina
UV	Ultravioleta

Capítulo 1: Relatório de estágio em Farmácia Comunitária

1. Introdução

O presente capítulo é constituído pela informação mais relevante relativa às experiências vividas e ao conhecimento adquirido no estágio em farmácia comunitária realizado no período de 26 de Janeiro a 13 de Junho de 2016. A maioria das horas de estágio foram passadas na Farmácia *Holon* Covilhã, passando no entanto, também, por breves períodos de tempo, pelas farmácias Pedroso, na Covilhã, e Diamantino, no Fundão (ambas, também, integrantes da rede de farmácias *Holon*).

1.1. As farmácias *Holon*

No ano de 2007, um conjunto de farmácias associou-se e criou um grupo intitulado de G60, com o propósito de centralizar as atividades de *back-office* e criar uma marca própria. Dois anos depois, em 2009, surgiu, do crescimento e desenvolvimento desse mesmo grupo, a entidade que detém as sociedades e marcas do grupo *Holon*, a *Holon SGPS*.¹ Nasceu, assim, uma rede de farmácias a nível nacional que, para além de partilharem um mesmo nome e uma mesma imagem, partilham também uma única visão das características que deve ter este tipo de estabelecimento de saúde, no que diz respeito à organização (quer a nível individual, quer inserido num coletivo), aos objetivos a atingir (quer internamente, quer perto da comunidade) e aos serviços prestados, por forma a obter uma máxima uniformidade. Esta uniformidade implica que a resposta de qualquer profissional de saúde a qualquer situação (desde o atendimento até aos serviços prestados) seja igual em todas as farmácias do grupo *Holon*, independentemente do ponto do país em que se localizam. Para auxiliar na concretização deste objetivo global, as farmácias *Holon* possuem uma série de protocolos e outros documentos próprios, redigidos com o propósito de serem seguidos por todos os indivíduos envolvidos no projeto.

A uniformidade no atendimento e prestação de serviços e o elevado grau de organização são características que visam distinguir positivamente as farmácias

Holon das restantes farmácias. É essencial também o bom funcionamento em equipa, para que haja uma fluidez máxima no circuito do medicamento, desde o momento em que é adquirido pela farmácia até ao momento em que chega ao doente. Outra característica de extrema importância que pretende dar destaque a este tipo de farmácias é o elevado grau de qualidade que se pretende atingir, conseguido através da implementação de um rigoroso Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ).

Para além disso, existe ainda um outro fator diferenciador: a existência de produtos de marca própria, que pretende divulgar e fortalecer o nome *Holon*. Encontramos produtos nas áreas de: primeira necessidade, dermocosmética, higiene oral e corporal, cuidado oftálmico, gestão de peso corporal, suplementos alimentares, vitaminas essenciais, dispositivos médicos, entre outros. Estes são geralmente mais vantajosos economicamente em relação a produtos semelhantes de marcas diferentes. Para uma maior divulgação da marca existe ainda publicidade diversa, incluindo uma revista própria.

Por fim, resta referir que o foco das farmácias *Holon* é maioritariamente um: as pessoas. O objetivo principal é a prestação de um serviço de excelência, que saiba dar resposta às necessidades do cliente, em particular, e da comunidade, em geral, fazendo da farmácia um espaço de saúde o mais completo possível.

2. Documentação

A existência de uma biblioteca básica na farmácia permite apoiar as competências técnicas do profissional de saúde, servindo-lhe de fonte de conhecimento, para que, em qualquer altura, seja possível o acesso à informação necessária à prática farmacêutica, esclarecendo dúvidas que surjam ao longo da realização das várias tarefas. É especialmente útil, por exemplo, aquando do acompanhamento e seguimento farmacoterapêutico de um determinado doente, permitindo pesquisar e saber mais acerca das patologias e medicação correspondentes. Fazem parte da biblioteca obrigatória a Farmacopeia Portuguesa e o Prontuário Terapêutico (ambos existentes na Farmácia *Holon* Covilhã).² Pessoalmente, este último manual foi-me bastante útil para adquirir e consolidar conhecimentos aquando da familiarização com os medicamentos existentes na Farmácia. O único outro livro obrigatório a existir na Farmácia é o Livro de Reclamações.² De entre a restante biblioteca existente na Farmácia *Holon* Covilhã, são de destacar o Formulário Galénico Português e o

Índice Nacional Terapêutico, assim como outros manuais de apoio, abrangentes das mais diversas áreas, como por exemplo: antibioterapia, farmacognosia, microbiologia, veterinária, direito e aconselhamento farmacêutico, dermofarmácia, etc.

As farmácias *Holon* têm ainda manuais e protocolos específicos, como mencionado previamente, a seguir pelo profissional de saúde, que abrangem a maioria das áreas e serviços: manual de instruções gerais, manual de atendimento, manual de recursos humanos, manual de funções, manual de gestão, manual de qualidade, manuais de serviços, manuais de projetos e ações de intervenção comunitária,... Estes manuais são atualizados continuamente (pelo menos anualmente, caso não haja necessidade de o fazer antes). Existem ainda documentos externos a seguir, como é o caso das Normas e Legislação Nacionais, e outros a consultar, como por exemplo os documentos relativos aos produtos provenientes dos fornecedores/laboratórios.

3. Pessoal e espaço físico

Dos recursos humanos da farmácia *Holon* Covilhã fazem parte: a gerência, composta por três farmacêuticos; um farmacêutico Diretor Técnico, que é também o Dinamizador da Qualidade; três farmacêuticas (incluindo a farmacêutica substituta); e dois técnicos de farmácia. Existe ainda um Representante da Gestão, externo à farmácia em si (como estabelecimento) mas pertencente às farmácias *Holon*.

Esta mesma farmácia inclui todos os espaços obrigatórios definidos pela legislação: sala de atendimento ao público, armazém, laboratório, instalações sanitárias, e vários gabinetes para atendimento personalizado e prestação de serviços. Abrange ainda alguns espaços facultativos, nomeadamente vestiários para funcionários e escritório. A dimensão de todas estas áreas encontra-se de acordo com o mínimo estipulado.³ Existe ainda uma área definida e separada da zona de atendimento, designada de área reservada, para entrada de encomendas. O *back office* está ainda organizado, para além das divisões físicas já mencionadas, em zonas atribuídas a determinadas funções, como por exemplo uma zona atribuída ao rececionamento de encomendas, ou outra atribuída ao armazenamento de documentação.

Na zona de atendimento, há uma clara organização do espaço de acordo com o tipo de produtos aí existentes. Da linha dos balcões para a frente encontra-se uma variedade de produtos de saúde, nomeadamente: de dermocosmética, capilares, de primeiros socorros, de sexualidade, e para mãe ou para o bebé. Estes produtos devem ser etiquetados, o que tive oportunidade de fazer, por forma a apresentarem o seu preço, para que este possa ser consultado livremente pelos clientes, sem a necessidade de assistência por um funcionário. Imediatamente atrás dos balcões, expostos nas prateleiras e dentro das gavetas, encontram-se os medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). A maioria dos medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) encontram-se armazenados num espaço fora do alcance visual e físico do cliente, e este armazenamento é feito pelo robô *Rowa Vmax*. Alguns MSRM, que o robô não consegue agarrar, pela forma da embalagem ou pela existência de películas, encontram-se também dentro de gavetas. O critério de armazenamento automático pode seguir dois tipos de predefinição diferentes, consoante o que se pretende privilegiar: a poupança de espaço ou a velocidade com que o medicamento chega ao profissional de saúde para ser dispensado (sendo que neste último caso as caixas vão ser arrumadas por forma a existir o mínimo espaço entre o ponto de arrumação do produto e o ponto de saída).

Na farmácia *Holon* Pedroso, os produtos encontram-se armazenados e dispostos de forma idêntica à mencionada, exceto os MSRM, cujo armazenamento é feito manualmente em gavetas no *back-office* da farmácia.

4. A atividade farmacêutica

A atividade do farmacêutico em farmácia comunitária pode ser considerada como sendo bastante diversificada, abrangendo várias áreas: o aprovisionamento, no qual se efetuam a gestão e receção de encomendas, assim como o correto armazenamento dos produtos rececionados; o atendimento, o qual, por forma a garantir que os produtos chegam ao cliente com a máxima qualidade, está intimamente relacionado com o controlo de temperaturas e humidades dos locais de armazenamento, o controlo de validades, o registo de estupefacientes e psicotrópicos e o registo de manipulados; o receituário; e a gestão financeira e de recursos humanos. Todas estas áreas de atuação estão, evidentemente, interligadas e são interdependentes (figura 1). Irei desenvolver cada um dos pontos referidos no seguimento do presente relatório.

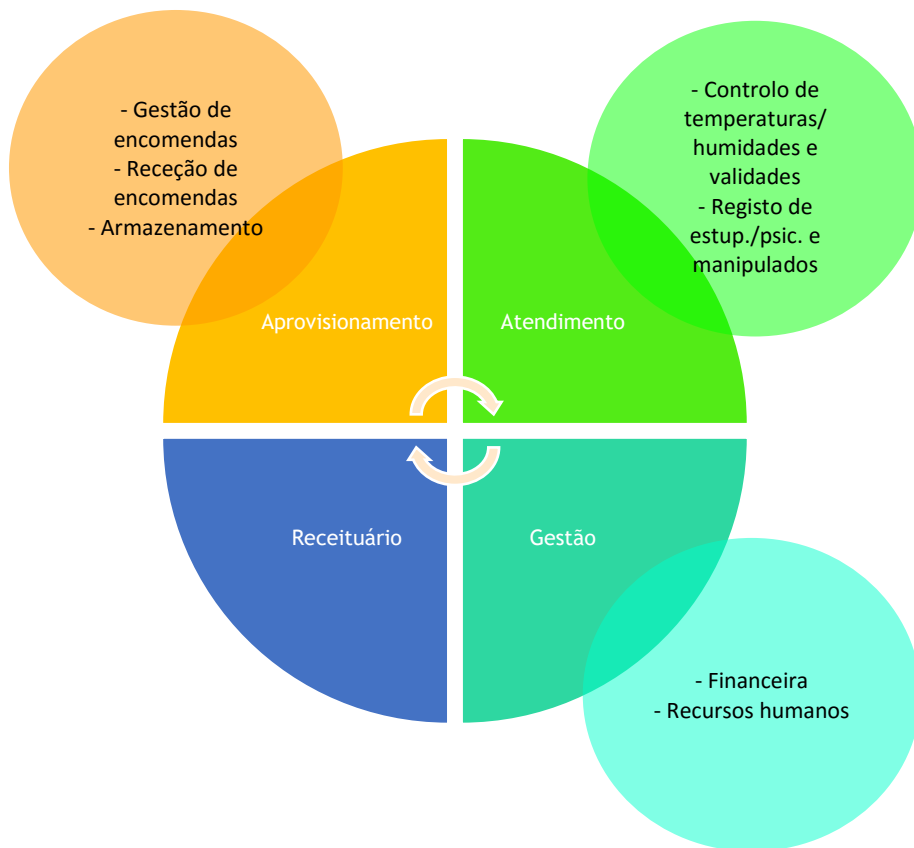


Figura 1 - A atividade farmacêutica em farmácia comunitária.

5. Aproximadamente

Foi no aproximadamente que iniciei o meu período de estágio. Como referido anteriormente, na farmácia *Holon Covilhã* o armazenamento da maioria dos MSRM é efetuada por um robô. No entanto, na farmácia *Holon Pedroso* já é feita manualmente em gavetas no *back-office* da farmácia. A cada gaveta está atribuído um código, para que seja possível saber a localização de qualquer medicamento a partir do sistema informático. A organização nas gavetas é feita por ordem alfabética.

Tive a oportunidade de efetuar o armazenamento de medicamentos em ambos os sistemas. No caso do armazenamento por robô, o único passo que está dependente da intervenção humana é a introdução no sistema informático do prazo de validade de cada medicamento, um a um, seguido da leitura ou introdução manual do código de barras. No caso do armazenamento manual em gavetas, basta abrir a gaveta correspondente ao código fornecido pelo sistema informático e colocar o medicamento no local apropriado. Neste tipo de procedimento, uma vez que há uma maior suscetibilidade ao erro humano, é necessário realizar periodicamente a contagem física de *stocks*, que também

tive a oportunidade de fazer. Esta consiste no confronto entre a listagem eletrónica do *stock* que é suposto existir em cada gaveta e o *stock* real. Em ambos os processos de armazenamento, para um mesmo medicamento, a embalagem que fica à frente deve ser aquela cujo prazo de validade irá expirar mais rapidamente (*first expire first out*) ou, caso existam prazos de validade iguais, aquela que chegou à farmácia em primeiro lugar (*first in first out*), para que seja dispensada primeiro.

Quanto aos fornecedores, estes podem dividir-se em duas categorias principais: distribuidores grossistas ou laboratórios propriamente ditos. Dentro da distribuição grossista destacam-se as empresas multinacionais, pela grande preponderância e influência económica que as caracteriza, e deste tipo de fornecedores são encomendados geralmente MSRM, maioritariamente de marca. Diretamente aos laboratórios são encomendados principalmente produtos de venda livre, tais como MNSRM e outros produtos de saúde, assim como alguns MSRM genéricos. Este tipo de política de encomendas é influenciada principalmente por razões financeiras, numa tentativa de minimização de custos. A escolha de fornecedores dentro de cada categoria prende-se ainda com uma série de pontos, nomeadamente: vantagens comerciais e financeiras (preços, descontos, prazos de pagamento), momento de entrega, quantidade a encomendar, produtos pedidos vs produtos recebidos, etc. Todos estes pontos são essenciais para que seja possível à farmácia assegurar uma elevada qualidade nos serviços prestados.

A encomenda em si pode ser feita manualmente, pelo operador, ou gerada automaticamente pelo sistema informático, sendo apenas necessária a sua posterior aprovação. A geração automática é baseada no *stock* existente: assume-se necessário encomendar um produto quando é atingido o *stock* mínimo definido para o mesmo, pretendendo-se alcançar o *stock* máximo. A definição dos *stocks* mínimos e máximos é determinada pelo operador, através da análise da periodicidade de vendas do produto na farmácia.

Tive também a oportunidade de realizar a receção de encomendas, utilizando o Programa informático *Sifarma 2000*. Este processo é constituído por uma série de passos, que consistem em: primeiramente, na leitura ou inserção manual do código de identificação da fatura correspondente à encomenda; de seguida, na introdução do valor total da encomenda e leitura dos códigos de barras dos produtos um a um, conferindo-se sempre o prazo de validade; e, por fim, na verificação de todos os dados introduzidos, fazendo as alterações necessárias

aos preços de faturação assumidos pelo sistema para que, no final, o total a pagar calculado pelo programa seja coincidente com o valor da fatura.

6. Gestão e controlo de qualidade

Os objetivos e metas globais a atingir pela farmácia são definidos pela Gerência, que os comunica ao Representante de Gestão e ao Diretor Técnico, que por sua vez informam a restante equipa da farmácia. O fluxo de informação, em geral, deve ser recíproco, sendo feito em todas as direções (figura 2).



Figura 2 - Fluxo de informação pretendido entre os profissionais da farmácia.

O cumprimento desses objetivos é verificado pela monitorização de resultados, feita periodicamente ao longo do ano. Os resultados analisados incluem: desempenho de vendas, dinamização de serviços, dinamização da intervenção farmacêutica e campanhas de marketing. Baseado na informação resultante da análise feita, poderão ser implementadas ações preventivas ou corretivas, de forma a impedir, respetivamente, a ocorrência ou recorrência de não conformidades.⁴

O objetivo da implementação de um SGQ é a melhoria contínua, que deve ser atingida diariamente. É gerido em cada estabelecimento pelo Representante da Gestão, em coordenação com o Dinamizador da Qualidade nomeado. Na farmácia *Holon Covilhã* o SGQ está de acordo com o definido legalmente, cumprindo os requisitos da Norma NP EN ISO 9001:2008, e é aplicado a todas as atividades desenvolvidas: dispensa de medicamentos, dispositivos médicos, suplementos alimentares e produtos de saúde; preparação de medicamentos manipulados; aconselhamento farmacêutico; prestação de serviços de saúde; e intervenção comunitária.^{1,5} A existência de manuais para a maior parte dos serviços e atividades é parte integrante deste sistema, facilitando o alcance das metas.

A análise das reclamações constitui um auxílio para a perceção da satisfação dos clientes e, indiretamente, da sua opinião acerca da qualidade dos serviços

prestados na farmácia. Embora seja obrigatória a existência de um livro de reclamações e o seu preenchimento seja a única forma de formalizar uma reclamação, os clientes podem reclamar através de outros meios, nomeadamente de forma verbal, ao balcão ou por telefone, ou de forma escrita por correio eletrónico. Quando o cliente pede a formalização de uma reclamação deverá ser o farmacêutico Diretor Técnico ou substituto a auxiliar no preenchimento do formulário.⁴

A verificação da implementação do SGQ é feita por auditorias internas e externas. As auditorias internas, embora não concedam certificação, avaliam a existência de não conformidades e/ou oportunidades de melhoria, com o objetivo de possibilitar o aumento da qualidade dos processos, para que, posteriormente, possa haver certificação externa. Do controlo interno faz parte uma iniciativa designada de *Cliente Mistério*, na qual um indivíduo contratado pelo próprio grupo *Holon* se dirige à farmácia fazendo-se passar por um cliente comum, por forma a averiguar se o atendimento está a ser feito adequadamente, seguindo os protocolos próprios.

É a avaliação por auditorias externas que possibilita que a farmácia seja certificada. Uma farmácia certificada rege-se por objetivos anuais, atingidos mais facilmente através da divisão de tarefas e existência de um descritivo das mesmas, e monitorizados através do registo detalhado de todos os parâmetros e ações. A implementação do SGQ segue o modelo PDCA (*Plan, Do, Check, Act*) (figura 3).

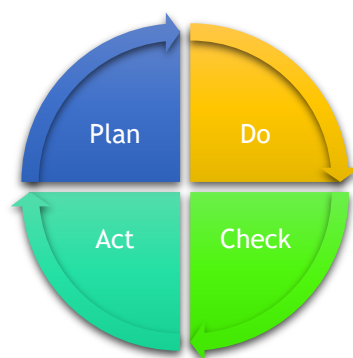





Figura 3 - Modelo PDCA.

Para facilitar o bom funcionamento das farmácias, existe ainda uma entidade de apoio, externa a cada estabelecimento em si mas pertencente ao grupo *Holon*, que presta uma série de serviços que, embora não seja necessário serem

realizados na própria farmácia, não deixam de ser importantes. Estes serviços enquadram-se em vários âmbitos: marketing, projetos e serviços, operações e logística, finanças e recursos humanos.¹ O objetivo desta divisão passa por retirar do encargo do farmacêutico tarefas que lhe ocupavam tempo mas não faziam parte da sua formação específica, possibilitando assim uma maior concentração de esforços na prestação do melhor serviço ao cliente.

Para uma melhor organização de todo o processo de trabalho, nas zonas de rececionamento de produtos existe etiquetagem diferenciada, utilizando cores distintas, com o intuito de distinguir entre os diferentes produtos não armazenados (tabela 1): os que estão por conferir, estão já conferidos ou não estão conforme; e os que já se encontram introduzidos no sistema informático ou não. O mesmo tipo de etiquetagem é aplicada em gavetas de receituário para distinção entre receitas não conferidas, conferidas apenas uma vez ou conferidas duas vezes (número de vezes recomendado), e entre receitas a necessitar de correção ou não. Estão também etiquetados, a amarelo, outros casos, tais como: produtos a enviar para outras farmácias, declarações de consentimento por ordenar e produtos cuja validade expira em menos de três meses.

Tabela 1 - Cores de etiquetagem e significados correspondentes.

Cor	Produtos	Produtos (frigorífico)	Receitas	Outros
Vermelho 	Não conforme	Reservas	Por conferir / com erros	-
Amarelo 	Por conferir/ introduzir no sistema	Não introduzidos	Em correção / conferidas uma vez	Declarações de consentimento por ordenar, produtos cuja validade expira em menos de três meses
Verde 	Conferidos e introduzidos no sistema	Introduzidos	Corrigidas / conferidas duas vezes	-

É também de referir que, para produtos com menos de um mês de validade, efetua-se geralmente uma tentativa de devolução ao fornecedor, que pode atuar de três formas distintas: ou substitui o produto, ou dá uma nota de crédito ou não aceita de todo a devolução. Para além de um prazo de validade quase a expirar, existem outras razões para a devolução de um produto, tais como: uma validade já ultrapassada, a embalagem estar danificada, o produto não ter sido encomendado, ou o preço de faturação estar incorreto.

Faz também parte do controlo de qualidade a calibração de todo o equipamento tecnológico existente na farmácia, feita por uma empresa externa certificada. É de destacar a calibração dos tensiómetros, das balanças e dos termohigrómetros. Os termohigrómetros são, como o nome indica, sondas de temperatura e humidade. Para a farmácia *Holon Covilhã*, o intervalo de temperaturas estabelecido para as áreas de dispensa, armazenamento e preparação de manipulados é de 15 a 25°C, e para o frigorífico vai de 2 a 8°C. Para as mesmas áreas, o intervalo de humidade aceitável é entre 40 a 70%, sendo que para o frigorífico pode ir até aos 100%. O controlo dos registos dos vários termohigrómetros deve ser feito semanalmente, pelo responsável nomeado, e anualmente, devem ainda ser feitas medições em zonas “sensíveis” da farmácia, isto é, zonas mais suscetíveis de sofrerem variações de valores ou cujas variações possam afetar significativamente o estado de conservação dos produtos aí existentes. Sendo assim, devem-se avaliar vários locais na zona de dispensa e armazenamento e várias zonas de várias prateleiras do frigorífico, fazendo-se a rotação da sonda pelos diversos pontos.

A qualidade passa também pela existência de um receituário organizado e com todas as características exigidas pelos organismos que efetuam o controlo desse tipo de documentos. Cada receita deve ser conferida pelo menos uma vez. Tive a oportunidade de fazer essa conferência e, no caso das receitas designadas de eletrónicas validadas em papel (99x), há apenas a necessidade de fazer a conferência uma única vez, pois estão menos suscetíveis ao erro que as restantes, devendo-se verificar a existência: da assinatura do médico, da assinatura do cliente, da rubrica do profissional que efetuou a dispensa, da data de dispensa e do carimbo da farmácia. Quanto às restantes receitas, não sendo automaticamente validadas, para além dos parâmetros mencionados deve ainda confirmar-se se a medicação dispensada coincide com a prescrita e se o nome do médico e do doente estão corretos. A verificação destas receitas deve ser

efetuada por duas pessoas diferentes, ou seja, duas vezes, uma vez que há uma maior suscetibilidade ao erro.⁶

Caso o organismo de faturação pertença ao Sistema Nacional de Saúde (SNS), os lotes completos de receitas serão enviados para o Centro de Conferência de Receituário do SNS, juntamente com o verbete de cada lote (resumo da informação das receitas que o constituem) e o resumo verbete de lotes (resumo da informação de todos os lotes de receitas enviados). Do resumo verbete de lotes são emitidas 2 cópias: o original, que é enviado para o SNS, e o duplicado, que permanece na farmácia por razões contabilísticas. Os lotes de receitas têm ainda que ser enviados dispostos de forma ordenada. Tive a oportunidade de organizar uma série de receitas, e esta organização consiste em: primeiramente, juntar as receitas que tenham o mesmo organismo de faturação, ou seja, um mesmo código para esse organismo (por exemplo, 99x para as receitas eletrónicas com comparticipação do estado); de seguida, dentro do mesmo organismo de faturação, organizar as receitas por lote; e, por fim, dentro de um mesmo lote, organizar as receitas por número de receita.⁶

Para além do receituário, ainda tem de ser enviada informação acerca da faturação mensal da farmácia. Assim, todos os meses são emitidas 4 cópias da faturação: o original e o duplicado, que são enviados para o SNS, o triplicado, que é enviado para a Associação Nacional de Farmácias (ANF) e o quadruplicado, que permanece na farmácia para contabilidade.⁶

Para organismos de faturação que não façam parte do SNS, do resumo verbete de lotes são emitidas 4 cópias: o original, o duplicado e o triplicado, que são enviados para a ANF (que, por sua vez, fica com o triplicado e envia os restantes para o respetivo organismo de faturação) e o quadruplicado, que permanece na farmácia (contabilidade). O mesmo acontece com as 4 cópias da fatura do mês.⁶

As receitas de psicotrópicos, pertencentes às tabelas de classificação I e II, têm um procedimento de registo diferente. Embora o documento original tenha o mesmo destino que o restante receituário, uma fotocópia da receita juntamente com o documento de dispensa de psicotrópicos são arquivados em *dossiers* próprios, que ficam guardados na farmácia um mínimo de 3 anos. O responsável por conferir todo o registo deste tipo de medicação, cuja receita é classificada de “especial”, é o Diretor Técnico (ou farmacêutico substituto, na sua ausência). A gestão de estupefacientes e psicotrópicos é feita mensalmente,

assim como o envio do registo de dispensa destes medicamentos e, caso existam, das cópias das receitas manuscritas em formato digital para o INFARMED.⁷

No caso dos fármacos pertencentes às tabelas III e IV (p.e. maioria das benzodiazepinas), embora a gestão da informação deva ser também feita mensalmente, apenas é enviado o mapa balanço anual, isto é, o resumo do receituário, uma vez por ano, também para o INFARMED. Para além deste registo também são arquivadas, nos dois casos, as requisições enviadas pelos fornecedores, que acompanham cada encomenda individualmente (para fármacos pertencentes às tabelas I e II) ou que são enviadas apenas quinzenalmente (para os fármacos pertencentes às tabelas III e IV). O documento original deverá permanecer na farmácia durante 3 anos e o duplicado deverá voltar ao armazém de origem.⁷

Para ser possível um controlo rigoroso de tudo o que se passa na farmácia, de modo a perceber se estão a ser cumpridos todos os requisitos de qualidade, é ainda de extrema importância o registo de todos os parâmetros e atividades em impressos próprios (parte integrante do SGQ): verificação de receituário, controlo do serviço *check-saúde*, registo de participação em programas na comunidade, fichas de equipamento, registo de não conformidades, registo de ações corretivas e ações de melhoria, etc.

7. Atendimento

O atendimento deve constituir uma abordagem integrada e orientada para o cliente. Para um serviço de excelência, tanto as competências comportamentais como as competências técnicas do profissional de saúde devem ser otimizadas, devendo este tentar sempre satisfazer as necessidades percebidas, mostrando a máxima disponibilidade e tendo uma atitude proactiva, e atualizar continuamente os conhecimentos dos quais depende a sua prática profissional.

Existe um protocolo *Holon* específico para o atendimento, que se encontra representado, de forma geral e simplificada, no esquema abaixo (figura 4).



Figura 4 - Progressão geral do atendimento numa farmácia *Holon*.

O protocolo dita que, sendo o primeiro contacto com o cliente, a receção deve ser feita privilegiadamente na zona de público. Assim, o farmacêutico deve sair de detrás do balcão e ir ao encontro do utente a meio da farmácia. Aí, decide que tipo de atendimento será, no seu entender, necessário, dos três níveis existentes:

- Nível I, realizado na própria zona de público ou no balcão de atendimento, que se destina a todos os clientes que procurem produtos de saúde ou suplementos alimentares, ou ainda MNSRM ou MSRM destinados a patologias agudas ou crónicas controladas, cuja situação seja de rápida resolução, e por isso requeiram um atendimento mais rápido;

- Nível II, realizado no posto de atendimento sentado ou num dos gabinetes de consulta, destinado a clientes com dificuldades motoras, idosos e grávidas, pedidos que exijam uma maior privacidade ou pedidos que requeiram uma atenção mais especializada, como é o caso de clientes com um regime terapêutico mais complexo ou quando existe uma maior propensão para efeitos adversos ou interações medicamentosas;

- Nível III, realizado apenas no gabinete de consulta, que se destina a clientes que requeiram um atendimento diferenciado com o máximo de especialização, encontrando-se aqui inseridos os diversos serviços prestados pela farmácia, com a realização de consultas mediante marcação prévia (acompanhamento

farmacoterapêutico, administração de vacinas, consulta do pé diabético, etc; ver ponto 6).⁸

O balcão das farmácias *Holon* é de tamanho pequeno propositadamente, por forma a diminuir a barreira entre o utente e o profissional de saúde. Sempre que possível, deve também existir no sistema informático (*Sifarma 2000*) uma ficha atualizada contendo a informação de cada doente, nomeadamente o seu histórico de patologias, medicação e parâmetros bioquímicos. Esta informação deve constar da ficha de cliente, ou ficha de acompanhamento, e permite o acesso rápido e fácil a este tipo de dados, para que com um perfil fisiopatológico e farmacoterapêutico do doente o atendimento possa ser feito de forma mais segura, sendo mais simples evitarem-se problemas relacionados com a medicação, nomeadamente duplicações ou medicação potencialmente inapropriada.

Cada medicamento ou produto de saúde deve ser dispensado acompanhado de informação verbal e, sempre que possível, escrita, sob a forma de etiquetas a colocar nas embalagens. Esta informação deve consistir das indicações mais importantes para o uso correto do produto, principalmente no que diz respeito a posologia, duração do tratamento, indicações de toma e outras informações relevantes, tais como efeitos adversos comuns e/ou graves que possam surgir. Deve tentar-se assegurar a compreensão por parte do utente, fator essencial para a obtenção dos melhores resultados terapêuticos possíveis. Desta forma, nenhum atendimento deve passar por ser uma mera dispensa. Mesmo no caso da medicação crónica, no qual o doente já saberá, muito provavelmente, o presumido necessário, a atitude não deverá ser passiva, devendo-se reforçar informação importante e esclarecer alguma dúvida que possa existir.

Derivado da minha própria experiência de atendimento, no que diz respeito a conselhos gerais a facultar no caso de medicação e/ou sintomatologia particular, é de referir que:

- No caso dos anti-inflamatórios não esteroides (AINE's) - Ex: ibuprofeno, diclofenac, etodolac - deve-se efetuar a toma sempre após uma refeição, uma vez que, ao serem inibidores não seletivos da COX, podem provocar um efeito irritativo da mucosa gástrica ao inibirem a produção de prostaglandinas pela isoenzima 1, presente no estômago. Estas, por sua vez, vão levar à produção de uma menor quantidade de muco protetor, ficando o órgão mais suscetível aos efeitos corrosivos do ácido gástrico.

- No que diz respeito aos antibióticos sistêmicos, deve-se aconselhar fazer a toma sempre às mesmas horas (para evitar a obtenção de concentrações plasmáticas supra ou subterapêuticas) e cumprir o tratamento até ao fim do indicado (há uma tendência geral para parar o tratamento quando se sentem melhorias sintomatológicas). Deve-se alertar ainda para a possibilidade de redução da eficácia dos métodos contraceptivos orais, pelo que se aconselha a utilização de um método barreira adicional. Pode também aconselhar-se um suplemento alimentar de reposição da flora gastrointestinal (ex: *UL-250*, *Aero-Bio*, *Atyflor*), uma vez que o antibiótico poderá não só destruir os microrganismos patogénicos como também a flora saprófita. No caso das penicilinas e derivados, deve sempre perguntar-se se a pessoa já teve uma reação alérgica prévia conhecida àquela família de fármacos.

- No caso da sintomatologia gripal, há uma série de abordagens que podem ser levadas a cabo. Para clientes com tosse, a abordagem pode passar pelos xaropes à base de extratos naturais *Grintuss* e *Bronchodual*, ambos indicados tanto para tosse seca como para tosse com expectoração (o que constitui uma vantagem no processo de decisão por parte do profissional de saúde, uma vez que muitas vezes há alguma dificuldade por parte dos doentes em descrever as suas características sintomatológicas). O *Grintuss* é um xarope à base de extratos liofilizados naturais de tanchagem (anti-inflamatório e analgésico), grindélia (demulcente) e perpétua-das-areias (anti-inflamatório e adstringente), que vai contribuir para a diminuição da sensação de irritação orofaríngea, favorecendo, ao mesmo tempo, a eliminação de muco (caso exista). Tem ainda mel (ação protetora e emoliente), pelo que não pode ser dispensado a doentes diabéticos. Para esse tipo de doentes pode ser dispensado o *Bronchodual*, cuja formulação não contém açúcares, e que contém extrato seco de tomilho e extrato líquido de raiz de alteia, que em conjunto têm propriedades anti-inflamatórias, antissépticas, antitússicas e mucolíticas. Ainda dentro da terapia local podem ser cedidas uma diversidade de pastilhas e sprays. É o caso das pastilhas *Streptfen*, que contêm flurbiprofeno, um AINE com propriedades anti-inflamatórias e analgésicas locais. Caso se queira optar por uma alternativa mais natural, existem as pastilhas *Salvigol*, que, contendo extratos de sálvia, aloé vera e mirra de cortiça (*Commiphora myrrha*), têm uma ação anti-inflamatória, anestésica local, antibacteriana e antifúngica, levando à formação de uma película protetora sobre as zonas irritadas (efeito barreira), tendo ainda o efeito refrescante da hortelã-pimenta, que irá provocar um alívio imediato. No que diz respeito à terapia sistémica, o mais comum de ser dispensado é o analgésico/antipirético paracetamol ou o AINE ibuprofeno. Existem ainda associações de princípios ativos no mercado, como por exemplo o *Griponal*, que

associa a ação analgésica/antipirética do paracetamol com a ação antialérgica do anti-histamínico clorfenamina. O aconselhamento vai depender de diversos fatores, tais como sintomatologia, doenças concomitantes, alternativas já testadas e que não foram bem-sucedidas e, ainda, a preferência do doente.

- No que diz respeito à medicação para a artrite gotosa, muitos doentes tomam, erradamente, como terapia profilática, a colquicina, um alcalóide com propriedades anti-inflamatórias. No entanto, devido à evidência de alteração da função hepática e renal com o seu uso prolongado (para além de outros efeitos adversos dose dependentes, como o aparecimento de diarreia e dor abdominal), este fármaco deve ser apenas utilizado em períodos de tempo curtos, ou seja, para alívio sintomatológico de crises agudas de gota. Ainda assim, existem outros anti-inflamatórios, como por exemplo alguns inibidores seletivos da COX-2 (p.e. etoricoxib), cuja utilização nas crises agudas é preferível, devido à menor incidência de efeitos adversos. Da terapia aguda fazem ainda parte medidas não farmacológicas que devem ser aconselhadas ao doente, nomeadamente o repouso do(s) membro(s) e a aplicação de gelo localmente. Para a terapia profilática deve usar-se o fármaco alopurinol, um inibidor da xantina oxidase, enzima responsável pela oxidação de xantina a hipoxantina e desta, por sua vez, a ácido úrico. Deve aconselhar-se o doente a tomar este fármaco a ingerir uma elevada quantidade diária de água, uma vez que vai auxiliar na excreção do ácido úrico, diminuindo assim a probabilidade de formação de cristais, e evitando a sua acumulação nas articulações. Pode ainda fornecer-se ao doente informação acerca de medidas preventivas, nomeadamente evitar o consumo de álcool ou marisco, fazer uma dieta equilibrada e praticar exercício físico (uma vez que tanto o excesso de peso como a diabetes, a hipertensão e a hipercolesterolemia predis põem para o aparecimento da doença).

- No caso dos medicamentos de preparação para colonoscopia (ex: *Picoprep* - picossulfato de sódio), há que fazer um aconselhamento detalhado acerca dos cuidados a ter nos dias anteriores à efetuação do exame: beber muita água ou outros líquidos transparentes, por forma a repor os fluidos perdidos como consequência do efeito laxante do medicamento; evitar ingerir, nos três dias anteriores, alimentos ricos em fibras (legumes, leguminosas, cereais) para não espessar o conteúdo intestinal, e evitar também alimentos de cor vermelha (morangos, tomate, gelatina), para evitar o aparecimento dessa cor nas dejeções, que poderá levar a resultados erróneos (semelhança com sangue); e, no dia anterior, fazer uma dieta exclusivamente líquida.

- Para doentes a tomar antidiarreicos, é muito importante evitar a desidratação. Assim, podem ser aconselhados sais de rehidratação, como *Dioralyte* (glicose, cloreto de sódio, cloreto de potássio e citrato disódico) ou associações que combinem a rehidratação com o uso de próbióticos, por forma a ajudar também a restaurar a flora gastrointestinal. Dentro destas associações encontra-se o *Bi-Oral Suero*, um líquido composto por múltiplos sais que ajudam a repor o equilíbrio eletrolítico e cuja embalagem contém uma palhinha com *Lactobacillus reuteri Protectis*, um próbiótico, na ponta, que pela sua localização vai ser ingerido juntamente com o líquido.

- No que diz respeito ao tratamento ocular, em caso de existência de secura, apenas, pode ser aconselhado o uso de uma solução oftálmica estéril lubrificante com ácido hialurónico a 10%, por forma a melhorar a hidratação e, conseqüentemente, o conforto ocular. Esta opção é geralmente eficaz devido ao facto de o ácido hialurónico ser um componente que já existe naturalmente no olho, formando uma película protetora hidratante e resistente à evaporação. No caso de existência de irritação ocular, principalmente na época mais propensa ao aparecimento de alergias e/ou em pessoas com antecedentes alérgicos, é aconselhável o uso de um colírio calmante, como, por exemplo, o da marca *Optrex*, constituído por água de extrato de *Hamamelis virginiana*, com efeito atenuador da irritação e de limpeza da superfície ocular. Não existindo melhoria sintomatológica deve-se ponderar, claro, o uso de um anti-histamínico oral. É ainda de referir que antes da aplicação de qualquer colírio se deve limpar o globo ocular com soro fisiológico (NaCl 0,9%) esterilizado (unidoses) e compressas também esterilizadas, por forma a remover possíveis secreções lacrimais antes de aplicar o produto, para que possa assim haver uma máxima absorção.

De seguida, apresentarei alguns casos particulares de atendimentos efetuados, que achei relevantes no que diz respeito ao enquadramento e aconselhamento prestado:

Caso 1 - Um senhor dirigiu-se ao balcão pedindo para medir a glicémia, pois nos últimos 3 dias tinha obtido valores muito baixos com o aparelho que tinha em casa (o último valor tinha sido 24 mg/dL), e pensava que pudesse estar danificado. No entanto, utilizando o aparelho da farmácia, o valor obtido continuou a ser baixo (46 mg/dL). Perguntei-lhe então se se andava a sentir cansado ou com tonturas ocasionais, o que ele confirmou. Disse-me que estava a tomar *Eucreas* 1000/50 mg (metformina/vidagliptina) ao pequeno-almoço e ao

jantar, e que tomava ainda metformina 1000 mg de manhã, que lhe tinha sido prescrito pelo médico na última consulta (há 3 dias atrás), para tomar apenas em SOS. Sendo assim, estando já a tomar a dose máxima diária de metformina (3000 mg), aconselhei-o a tomar apenas a metformina 1000 mg em SOS, e continuar a tomar o resto da medicação de forma idêntica, medindo a glicémia com frequência de modo a monitorizar a existência, ou não, de melhoria de resultados. Pedi-lhe ainda que voltasse à farmácia dentro de alguns dias para dar o *feedback* da situação.

Caso 2 - Uma senhora dirigiu-se ao balcão pedindo *Brufen* 400 e *Ben-u-ron* 500, comprimidos, para levar para a mãe, uma mulher idosa que por vezes tinha dores de origem não diagnosticada. Já tinha ido a vários médicos, mas todos lhe diziam que era “da idade” e, como ela própria tomava aqueles dois medicamentos alternados quando tinha dores, pensava ser o indicado. No entanto, quando lhe perguntei que medicação é que a mãe estava a tomar, de entre os fármacos encontrava-se o rivaroxabano (*Xarelto*), um anticoagulante. Sendo assim, apenas dispensei o *Ben-u-ron*, uma vez que os AINE's, como o ibuprofeno, são inibidores da agregação plaquetária, existindo risco de ocorrer hemorragia.

Caso 3 - Uma senhora dirigiu-se ao balcão pedindo algo que pudesse aplicar para aliviar o inchaço que tinha no pulso, que surgiu devido a uma entorse. Aconselhei, primeiramente, a ida ao hospital para a realização de exames por forma a verificar a não existência de qualquer fratura. Seguidamente, dispensei então *Voltaren emulgel* 10 mg/g (diclofenac), aconselhando a sua aplicação 3 a 4 vezes ao dia na zona em questão, massajando, e intervalando com a aplicação da bolsa frio/quente *Nexcare*, também 3 a 4 vezes por dia (após colocação no congelador), durante períodos de 20 minutos, para o alívio da inflamação local e do próprio edema.

Caso 4 - Um senhor dirigiu-se ao balcão com um inchaço bastante visível na face do lado esquerdo. Queixava-se de dor de dentes, no entanto queria evitar ao máximo a ida ao médico dentista. Aconselhei-o a tomar ibuprofeno 400 mg comprimidos de 6 em 6 horas, pelo seu efeito analgésico e anti-inflamatório, e bochechar 3 vezes ao dia com o colutório *Eludril Classic*, constituído por clorohexidina 0,1%, com propriedades antissépticas e anti-inflamatórias locais, e clorobutanol 0,5%, com propriedades analgésicas locais. Aconselhei, no entanto, também, caso o inchaço e a dor não passasse nos 3 a 4 dias seguintes, ir ao

médico dentista, pois poderá tratar-se já de uma infecção e terá de ser aplicada a terapia adequada.

Caso 5 - Uma senhora dirigiu-se ao balcão dizendo que lhe tinha surgido, na noite anterior, diarreia e solicitando algo que a pudesse solucionar. Não apresentava febre nem mal-estar generalizado, pelo que não pareceu, à partida, uma diarreia de origem bacteriana. Aconselhei-a, no entanto, a ter atenção ao possível surgimento desse tipo de sintomas, e recorrer ao médico caso isso ocorra, pois poderá necessitar de recorrer a antibioterapia. Dispensei o dispositivo médico *Dimexanol* que, para além de conter sais de rehidratação na própria formulação, é composto por uma argila natural de silicato de alumínio e magnésio, a diosmectite, com propriedades absorventes que vai formar uma barreira protetora intestinal, não deixando passar para o TGI uma tão elevada quantidade de água, que, desta forma, não é excretada nas fezes, e vai ao mesmo tempo adsorver um eventual agente causador (bactéria, vírus).

Caso 6 - Uma senhora dirigiu-se ao balcão com uma receita de *Lasix* (furosemida) para aviar. Queixava-se também de câibras que surgiam com alguma frequência, e solicitou algo para o seu alívio sintomatológico. Uma vez que os fármacos de ação diurética causam depleção de sais, incluído o ião magnésio, e este é necessário para a manutenção do equilíbrio eletrolítico, com influência direta na formação de potenciais elétricos, a sua depleção poderá causar um desequilíbrio que irá dar origem a contrações musculares espontâneas (mais comumente conhecidas como câibras). Dispensei então, adicionalmente, à cliente um suplemento contendo óxido de magnésio e vitaminas, por forma a repor o equilíbrio perdido e no intuito de contrariar a formação desses potenciais espontâneos.

Caso 7 - Uma senhora dirigiu-se ao balcão queixando-se de sentir as pernas cansadas e inchadas, situação derivada de o seu dia-a-dia exigir que passe muito tempo de pé, tendo inclusive desenvolvido varizes. Estava já a tomar Daflon, e queria algum creme que lhe provocasse um alívio rápido. Dispensei então o produto *HolonProtect Pernas Ativas*, um creme refrescante, hidratante e com efeito descongestionante local, que por ser constituído por extrato de castanha-da-índia (anti-inflamatório e ativador da circulação sanguínea) e ginkgo biloba (vasodilatador) tem um efeito de alívio quase imediato, melhorando a circulação do sangue nas zonas de aplicação e a sensação de pernas "pesadas". É ainda constituído por extrato de sementes de videira que, por ter um efeito protetor das fibras de colagénio e elastina, vai fortalecer e estabilizar as paredes

capilares, diminuindo desta forma a permeabilidade destes vasos e, conseqüentemente, o edema resultante.

Caso 8 - Um senhor dirigiu-se ao balcão expondo que, como consequência de ter contraído uma constipação, para a qual já se encontrava medicado, tinham-lhe surgido pequenas gretas na parte interna das narinas. Aconselhei-lhe a aplicação nas zonas afetadas da pomada reparadora *Eucerin Aquaphor*, cujo principal composto ativo, o bisabolol (extraído da camomila), para além de ter propriedades anti-irritantes e anti-inflamatórias, que vão provocar a diminuição do ardor, vai acelerar o processo de cicatrização. Contém também glicerina, que vai auxiliar na hidratação local (humectante, atrai água), e pantenol (pró vitamina B5), com propriedades calmantes, hidratantes e cicatrizantes.

Caso 9 - Uma senhora dirigiu-se ao balcão solicitando aconselhamento acerca do creme de rosto mais adequado ao seu tipo de pele. Disse que já tinha experimentado inúmeras marcas, mas que todas, mais tarde ou mais cedo, lhe provocavam irritabilidade e agravamento de uma vermelhidão já permanente. A observação da pele da senhora indicava, realmente, a existência de cuperose nas maçãs do rosto. Aconselhei então a aplicação diária do creme *Sensiphase AR da A-derma*, hipoalergénico, composto por extrato de plântulas de aveia *Rhealba*, cujas propriedades anti-inflamatórias e imunorregulatórias têm um efeito calmante e suavizante, diminuindo a reatividade cutânea. É ainda composto por vitamina E (antioxidante), água de extrato de *Hamamelis Virginiana* (descongestionante de poros, microcirculação melhorada, sensação de frescura) e pigmentos de cor verde, cujo contraste com a cor vermelha atenua a rosácea. Adicionalmente tem ainda fator de proteção solar, que irá diminuir a dilatação dos vasos sanguíneos pela radiação UV.

8. Serviços

Os serviços prestados na farmácia *Holon Covilhã* dividem-se, em termos de classificação, em serviços realizados por um prestador interno e serviços realizados por um prestador externo, segundo a pessoa que os executa. Um prestador interno será um farmacêutico da própria farmácia, e um prestador externo será um outro profissional de saúde, que não pertence ao quadro de pessoal do estabelecimento. Estes serviços são diversos, e consistem em: consulta farmacêutica, preparação individualizada da medicação (PIM), serviço *check-saúde*, consulta de nutrição, consulta de pé diabético, consulta de

podologia, consulta de dermofarmácia e administração de vacinas e injetáveis. Todos eles não só procuram resolver problemas, como também preveni-los. Antes da efetuação de qualquer consulta, o doente tem que assinar um documento de consentimento informado. São ainda realizadas diversas intervenções perto da comunidade.

8.1. Consulta farmacêutica e PIM

A consulta farmacêutica consiste, de forma geral, no acompanhamento farmacoterapêutico do doente. Pode ser sugerida por diversas razões, incluindo, por exemplo, quando no atendimento ao balcão se deteta alguma confusão por parte do doente em relação à medicação que está ou vai tomar, ou quando se deteta algum tipo de duplicação ou outro erro relacionado com o medicamento. É um serviço prestado principalmente a doentes polimedicados, ou seja, a tomar concomitantemente mais de quatro medicamentos, embora seja mais comum naqueles que tomam acima de 10, e/ou com patologias descontroladas. O doente idoso é o que mais é direcionado para este tipo de serviço por esta mesma razão (maior probabilidade de polimedicação devido a patologias múltiplas). Encontram-se também inseridos na consulta farmacêutica os programas de cessação tabágica e de deteção e controlo de asma e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC). Este tipo de intervenções permitem, não só solucionar problemas de saúde, como também prevenir complicações. Cada consulta consiste numa entrevista, realizada por um farmacêutico, que regista toda a informação relativa ao doente, às suas patologias e à medicação que toma, assim como ao grau de conhecimento do doente em relação a ela. Caso se verifique potencialmente benéfico, o doente pode ser encaminhado para os outros serviços. Uma sugestão de revisão/alteração da medicação pode ser enviada ao médico caso se detete essa necessidade. Assim, para além da redução de problemas relacionados com a medicação e da melhoria do estado geral de saúde do doente, este serviço pretende ainda quebrar a barreira médico/farmacêutico, melhorando a comunicação entre os dois profissionais de saúde, sempre em prol do doente e do aperfeiçoamento do conhecimento e da prática de cada uma das profissões.

No programa de cessação tabágica, geralmente ao balcão, o farmacêutico começa por uma abordagem rápida, questionando acerca do número de cigarros que a pessoa consome por dia, quando fuma o primeiro cigarro do dia e há quanto tempo é fumador. Depois, caso ache pertinente, poderá apresentar o

programa de cessação tabágica da farmácia, sugerindo a adesão do doente. Caso o doente aceite a sugestão, é encaminhado para o balcão de atendimento sentado, ou um dos gabinetes de serviços, onde irá ter a sua primeira consulta de cessação tabágica, na qual irá responder verbalmente e de forma escrita a uma série de perguntas que permitirão conhecer mais profundamente os seus hábitos tabágicos, assim como outros aspetos relevantes, por forma a ser possível sugerir a terapia farmacológica ou não farmacológica a mais adequada possível. É registada informação diversa acerca do indivíduo, da qual se destaca: dados biográficos, problemas de saúde e medicação, parâmetros fisiológicos e bioquímicos, hábitos de vida, avaliação dos hábitos tabágicos e razões para deixar de fumar. No registo de resultados da entrevista devem ser anotados os achados acerca do grau de dependência, da motivação para deixar de fumar e se existe ou não ansiedade ou depressão associadas. É determinado um dia D (dia previsto para a cessação), a terapêutica não farmacológica e farmacológica a instituir e se será necessário o encaminhamento do doente para o médico ou para um dos serviços de saúde existentes na farmácia. O acompanhamento presencial é feito inicialmente de 3 em 3 meses, depois de 6 em 6, e a seguir anualmente. Pode ser realizado também um acompanhamento telefónico. É essencial destacar a importância da cessação tabágica ao doente, tendo como argumentos os possíveis benefícios dessa cessação como, por exemplo, a diminuição do risco de doenças do aparelho respiratório, cardiovascular ou reprodutor, e possível carcinogénese. A terapia farmacológica mais utilizada e segura é a terapia de substituição da nicotina (TSN), que inclui gomas para mascar, pastilhas para chupar e adesivos transdérmicos.^{9,10}

No programa de deteção e controlo de asma e DPOC, geralmente também ao balcão, o farmacêutico começa por fazer uma série de questões rápidas e poderá pedir ao doente para preencher um questionário simples. O objetivo deste programa é constituir uma primeira abordagem na deteção de uma possível patologia respiratória, sendo uma ajuda ao diagnóstico, e não um diagnóstico em si, assim como auxiliar no controlo de uma doença já estabelecida. Embora a asma e a DPOC sejam patologias distintas, de etiologia diferenciada, e por isso requeiram tratamentos diferentes, têm vários sintomas em comum (dispneia, pieira, tosse crónica). Sendo assim, é muito importante fazer um diagnóstico diferencial. São fatores diferenciadores que podem ajudar no diagnóstico: o facto de a asma ser mais prevalente em pessoas mais jovens, enquanto que a DPOC predomina maioritariamente em idosos; o facto de a asma ser tipicamente despoletada por um agente específico, maioritariamente alérgenos, e a DPOC ser o resultado de uma limitação persistente do fluxo aéreo por uma resposta inflamatória crónica dos pulmões a partículas ou gases (p.e. fumo do tabaco); e

as características de alguma sintomatologia, como a dispneia, que é persistente e progressiva na DPOC (e variável na asma), ou a existência de sintomas recorrentes durante a noite, que acordam o doente, como por exemplo a pieira, situação bastante própria da asma. Para ambas as patologias recorre-se à espirometria para avaliar a função pulmonar do indivíduo. São medidos/calculados diversos parâmetros, tais como: o volume total de uma expiração forçada (FVC - *forced vital capacity*), o volume expiratório máximo num segundo (FEV1 - *forced expiratory volume*) e o índice de limitação do fluxo aéreo (FEV1%, resultado do quociente FEV1/FVC). Os valores obtidos irão depender de diversos fatores, tais como a idade, o peso, a etnia e o género. Um valor de FEV1 menor que 80% ou de FEV1% menor que 0,7⁸ são indicadores de uma possível obstrução da via aérea, e juntamente com a sintomatologia, frequência de exacerbações e exposição a fatores de risco vão auxiliar na abordagem a uma patologia possível ou estabelecida. No âmbito deste programa, também se faz na consulta farmacêutica o ensino da correta utilização dos dispositivos de inalação. De referir ainda que, no caso de uma DPOC diagnosticada, deve-se aconselhar a vacinação antigripal e antipneumocócica. ¹¹⁻

13

A PIM é sempre precedida de consulta farmacêutica e é geralmente feita para quem toma múltiplos fármacos diferentes e/ou quando existe alguma dificuldade por parte do doente em seguir o regime terapêutico. O doente permite então à farmácia ficar responsável pela sua medicação, levando semanalmente para casa a denominada *pill-box* (figura 5). Tive a oportunidade de efetuar a preparação deste tipo de caixas, nas quais os fármacos a tomar na semana seguinte são distribuídos por orifícios individualizados, correspondentes aos sete dias da semana e aos vários períodos do dia em que poderá ser feita uma toma (jejum, pequeno-almoço, almoço, lanche, jantar e deitar). O doente leva então apenas para casa a caixa de PIM para a semana seguinte e possível medicação SOS. Desta forma, é viável promover uma maior adesão à terapêutica, pela existência de uma maior organização, que irá ajudar a cumprir o regime medicamentoso, levando a potenciais melhorias no estado de saúde.



Figura 5 - Parte interior (esquerda) e exterior (direita) de uma *pill-box*.

8.2. *Check-saúde*

O serviço *check-saúde* é realizado sempre que solicitado pelo cliente ou sugerido pelo farmacêutico e aceite pelo cliente. Neste serviço pode ser efetuada a medição da pressão arterial e de diversos parâmetros bioquímicos, nomeadamente: glicémia, triglicerídeos, colesterol total, colesterol HDL e ácido úrico, no aparelho *CR300*, e PSA e hemoglobina glicosilada, no aparelho *i-Chrome*. Tive a oportunidade de ter formação acerca do manuseamento destes aparelhos, especialmente do *CR300*. Este é um espectrofotómetro e o procedimento geral consiste em: primeiramente, após a limpeza da área, fazer uma picada na ponta de um dos dedos do doente, por forma a sair uma pequena gota de sangue (rejeitar sempre a primeira gota), recolhendo-a para um tubo capilar de vidro; depois, inserir esse tubo numa covete, que já contém um líquido de leitura para diluição da amostra, agitando lentamente por inversão e introduzindo-a no aparelho para que este efetue a leitura do branco; por fim, adicionar um reagente do qual faz parte uma enzima específica de clivagem da molécula a ser determinada e, após agitação, inserir a covete já pronta no espectrofotómetro, por forma a fazer a leitura do parâmetro em causa. A quantidade de sangue requerida varia consoante o teste, sendo maior para a determinação do colesterol HDL e para o B-teste (colesterol total + glucose), e há ainda testes que requerem um passo intermédio de centrifugação, uma vez que só serão efetuados no plasma sanguíneo e não no sangue total (HDL e ácido úrico). Embora o colesterol LDL não possa ser medido, pode ser calculado pelo próprio aparelho através da medição do colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos, ou através da fórmula: $col_{total} - HDL - trig/5$. Para que os

resultados sejam fidedignos, a glicémia, os triglicérides e o colesterol HDL devem ser medidos apenas quando o indivíduo se encontra em jejum.

Os valores obtidos devem ser registados no cartão de registo do doente e, sempre que possível, no sistema informático, na respetiva ficha de acompanhamento. Deve ainda ser efetuado o aconselhamento que se percecione necessário, com possíveis medidas não farmacológicas e farmacológicas passíveis de serem aplicadas.

8.3. Nutrição

A consulta de nutrição é feita por uma nutricionista. A população alvo é, não só quem deseja emagrecer, mas também doentes cuja patologia implica uma alimentação cuidada, necessitando de aconselhamento para o fazer (distúrbios alimentares, diabetes *mellitus*, hipertensão arterial, dislipidémia, doenças intestinais). É uma consulta quinzenal, que se divide em várias fases.

Numa primeira fase, a nutricionista coloca uma série de questões ao cliente, com o preenchimento simultâneo de uma ficha de acompanhamento, incluindo: dados biográficos, motivo da consulta, parâmetros fisiológicos e bioquímicos, patologias e medicação, características do trânsito intestinal e da digestão, horário e constituição das refeições, e horário de sono.

Tive a oportunidade de assistir a uma consulta e, no caso específico de um indivíduo cujo objetivo seja perder peso, é-lhe pedido que se desloque até à balança, por forma a medir o seu peso e percentagem de massa gorda. E após a perceção do objetivo da pessoa (por exemplo, número de quilos que quer perder e em quanto tempo), é então feito o aconselhamento, que se foca principalmente na dieta. Ao contrário do que dita o senso comum, não é aconselhável fazer uma dieta restritiva, retirando da alimentação os hidratos de carbono e os açúcares completamente, uma vez que, embora se perca peso mais depressa, o metabolismo tem tendência a ficar mais lento, existindo assim uma maior probabilidade de a pessoa voltar a engordar aquando da reintrodução deste tipo de alimentos. Aconselha-se, sim, fazer várias refeições ao dia, comendo pouca quantidade de cada vez, com base numa dieta equilibrada que deve incluir: beber muita água; incluir pouca comida frita, refrigerantes, doces e gorduras; adicionar pouco sal; comer sopa (com o mínimo de batata), legumes e fruta regularmente; comer peixe e carne (de preferência branca) apenas em pequenas porções e poucas vezes ao dia; reduzir a ingestão de pão (que deve ser

integral, de mistura ou centeio); evitar por açúcar no café; procurar escolher queijo, leite e iogurtes magros; consumir manteiga sem sal; etc. É também importante que a pessoa nunca se deite com fome.

Uma vez que, para além de uma má alimentação, o sedentarismo está também na base de um estilo de vida pouco saudável, o aconselhamento passa também pela recomendação da realização de exercício físico regular, que ajuda a perder peso e a criar massa muscular. É de extremo relevo frisar a importância da persistência no cumprimento do regime alimentar e de atividade física, para que possa ser obtido o máximo benefício.

Por vezes, certos estilos de vida e suas consequências propiciam o aparecimento de condições de saúde específicas. A obesidade e a ingestão de bebidas estimulantes ou comidas picantes, que favorecem o aparecimento de refluxo gastroesofágico; uma fraca hidratação e elevada ingestão de sal, que podem precipitar o aparecimento de celulite; e a ingestão de comidas específicas, como o marisco, que propiciam o colesterol elevado, são apenas alguns exemplos.

No que diz respeito à implementação de medidas farmacológicas, não é aconselhável a utilização de fármacos que tenham um efeito direto no emagrecimento, como o orlistato, uma vez que pela inibição das lípases intestinais, e conseqüente redução da absorção de gorduras pela inibição da sua clivagem em pedaços mais pequenos, há a possibilidade do surgimento de alguns efeitos adversos, tais como desconforto abdominal e diarreia. Devem, assim, usar-se outro tipo de terapias, tais como suplementos alimentares constituídos por fibras solúveis, como o glucomanano (que dão ao indivíduo uma sensação mais rápida de preenchimento do estômago, diminuindo a vontade de comer) ou constituídos por outras substâncias, tais como a *L*-carnitina (ajuda no metabolismo das gorduras), a garcínia (diminui o apetite geral), o crómio (diminui o apetite específico para os doces) ou o ácido linoleico (ajuda a transformar gordura em músculo).

8.4. Pé diabético e podologia

A consulta do pé diabético é uma consulta mensal, cujo principal objetivo é a observação e avaliação dos pés do doente diabético, de modo a detetar

precocemente uma possível neuropatia. Pretende-se ainda prevenir retinopatias e nefropatias, numa abordagem integrada à doença, alertando o doente para a possibilidade de ocorrência deste tipo de complicações tardias.

No início da consulta, a enfermeira coloca uma série de questões, preenchendo a ficha de acompanhamento do doente, que inclui: dados biográficos, tipo e duração da diabetes, fatores de predisposição/desencadeamento que possam ter precipitado o aparecimento da doença (fatores genéticos, certos fármacos), comorbilidades, controle dos parâmetros e outras informações relevantes.

Em termos fisiopatológicos, tanto a neuropatia como a nefropatia e retinopatia diabéticas derivam da acumulação de glucose nas áreas afetadas. No caso da neuropatia, a acumulação de glucose nas extremidades dos membros inferiores irá formar uma camada que diminuirá a sensibilidade das terminações nervosas aí existentes à dor, ao calor e ao frio. Devido a esta dessensibilização, a percepção do doente relativamente a possíveis problemas que possam existir diminui também consideravelmente, sendo essencial este tipo de consulta para se fazer a deteção de unhas encravadas, feridas, calos e outras malformações que possam gerar complicações a longo prazo, nomeadamente através do desenvolvimento de uma infeção (que por sua vez poderá levar a complicações mais graves, nomeadamente à ulceração e, no limite, à necessidade de amputação do membro).

Na segunda fase da consulta, a enfermeira observa os pés com o intuito de perceber a sua integridade e de identificar possíveis alterações. Procede também ao corte de unhas.

A terceira fase é composta pela realização dos testes de sensibilidade à pressão (utilizando um monofilamento *Semmes-Weinstein* de 10g) e à vibração (utilizando um diapasão de 128 Hz).

No final da consulta é atribuído um grau de sensibilidade ao doente, consoante a resposta obtida aquando da realização dos testes: grau 0, quando o doente detém ainda toda a sensibilidade nos pés, sendo o acompanhamento que se segue anual; grau 1, quando o doente tem já alguma perda de sensibilidade, seguindo-se um acompanhamento que deve ser semestral; e grau 2, quando há uma perda elevada de sensibilidade e/ou existência de malformações, sendo o acompanhamento trimestral. O doente é ainda informado acerca dos cuidados a ter, que incluem: usar meias sem costuras ou elásticos; secar muito bem os pés

após o banho, principalmente entre os dedos, e aplicar creme hidratante diariamente; se possível, lavar os pés com vinagre de cidra; aplicar iodopovidona e/ou creme cicatrizante se detetar alguma fissura ou ferida; e evitar colocar os pés muito perto de fontes de calor.

O tratamento da maioria dos problemas identificados, nomeadamente calos, unhas encravadas e malformações do pé ficam já a cargo do serviço de podologia, estando os dois serviços, assim, intimamente relacionados. Quando já estamos perante feridas ou úlceras, o utente deverá ser encaminhado para o seu médico assistente.

Por sua vez, a consulta de podologia é realizada por uma podologista, cuja função é prevenir, detetar e tratar as patologias do membro inferior, nomeadamente do pé, como foi referido anteriormente (calos, verrugas, unhas encravadas, infeções fúngicas). É uma consulta quinzenal.

8.5. Dermofarmácia

A consulta de dermofarmácia é realizada por um farmacêutico e é, geralmente, uma consulta mensal. Neste tipo de consulta utiliza-se o aparelho *Arano TS*, assim como o respetivo programa informático, cujo objetivo é auxiliar o farmacêutico na determinação das características da pele e do cabelo do cliente, através do fornecimento de uma série de imagens e dados. Tive a oportunidade de efetuar a formação acerca da utilização deste dispositivo, e este é constituído por uma série de sensores, assim como uma câmara com lentes e luzes de radiação diferente, adaptáveis ao tipo de medição que se pretende efetuar. Para que os resultados sejam o mais fidedignos possível, deve pedir-se à pessoa que, no dia da consulta, não tenha lavado o cabelo ou aplicado qualquer tipo de creme ou maquilhagem no rosto, para se avaliar a pele e o cabelo no seu estado mais natural.

Na análise da pele, usam-se os sensores de hidratação (zona U), elasticidade (zona U) e oleosidade (zona T e U). Utilizando a câmara avalia-se também: a uniformidade da pele, o tamanho do poro, a pigmentação, a sensibilidade e a existência/profundidade das rugas. As imagens obtidas são comparadas com as

de referência para cada tipo de situação, existentes na base de dados do programa informático, auxiliando tanto o farmacêutico na análise, como o cliente na perceção dos resultados que lhe são apresentados, levando-o a aceitar mais facilmente uma possível intervenção. Aquando do aconselhamento no âmbito do cuidado da pele, existem uma série de sugestões gerais que se podem dar, nomeadamente: utilizar produtos de limpeza, fazer uma hidratação diária, fazer esfoliação uma vez por semana, e ingerir uma elevada quantidade de líquidos (uma vez que uma desidratação corporal geral tem repercussões diretas nas características da pele). No entanto, o restante aconselhamento terá de ser mais direcionado para as características do indivíduo.

Na avaliação capilar, utiliza-se também a câmara, com lentes de ampliação maior, e é avaliado: o padrão de queda, o estado do couro cabeludo, o tamanho do poro e a espessura e estado geral do próprio cabelo. O aconselhamento deve ser também adaptado a cada situação. Após cada consulta, é aconselhada a compra de produtos de acordo com as características capilares/de pele do cliente, mas tendo em conta também a gama de preços que lhe é acessível.

No que diz respeito a produtos de dermocosmética, na farmácia *Holon Covilhã* predominam três marcas com uma complexidade de formulação mais simples, e preço mais acessível: a *Eucerin*, a *Avène* e a *A-derma*. Das gamas de custo mais elevado, e também maior complexidade de formulação, existem três principais: a *Lierac*, a *Caudalie* e a *Filorga*.

Embora não exista uma linearidade absoluta, quanto maior for o grau de sensibilidade da pele, menor deve ser a complexidade da formulação, que deve conter constituintes já extensivamente estudados e comercializados (o que poderá excluir produtos à base de ingredientes naturais de descoberta relativamente recente). Assim, para este tipo de peles existem marcas como:

- A *Eucerin*, cujos produtos foram desenvolvidos maioritariamente para o controlo atópico, a irritação, a desidratação, a hipersensibilidade, a reparação e a cicatrização da pele (embora existam também produtos anti-rugas, para a hiperpigmentação, de limpeza e de proteção solar). Geralmente, a base da preparação é constituída por glicerina, glicerol e/ou parafina líquida, e os constituintes abrangem o ácido hialurónico (anti-rugas), a ureia (secura elevada a extrema) e o bisabolol (cicatrização, com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas), entre outros. Os ingredientes existem em número reduzido em

cada preparação, sendo, no entanto, eficazes. É uma marca que se foca principalmente no tratamento dermatológico, e não tanto em linhas de beleza;

- A *A-derma*, cujo principal foco e composição é semelhante à marca anterior, sendo adequada para peles atópicas, uma vez que as suas preparações não contêm parabenos, sabão ou óleos naturais. Existe ainda uma gama para peles acneicas, cujos produtos, não comedogénicos, se encontram a pH fisiológico, não contendo álcool e apostando nas propriedades calmantes e emolientes da aveia e na ação seborreguladora do ácido glutâmico;

- A *Avène*, cujos produtos são hipoalergénicos, não contendo perfumes ou parabenos, e que aposta por sua vez nas propriedades de alguns óleos vegetais naturais (sésamo, cártamo, coco,...), cujas características estão amplamente estudadas e conhecidas. Ao contrário das restantes marcas supracitadas, tem mais que uma linha anti-rugas (para adequação à idade da pele e profundidade das rugas).

Uma situação bastante peculiar com que me deparei na análise das várias gamas de dermocosmética, e que creio ser importante referir, foi o facto de, de entre uma tão ampla gama de produtos, haver uma escassez de opções ao nível dos tratamentos anti-envelhecimento para peles hipersensíveis. Embora as marcas supracitadas sejam das mais indicadas para este tipo de característica, a maioria dos cremes anti-rugas têm constituintes que, embora não causem, geralmente, reatividade em contacto com peles de sensibilidade moderada, são potencialmente reativos no caso da pele ter uma sensibilidade mais elevada. É o caso dos produtos anti-idade da *Avène* e da *Eucerin*, que têm entre os seus constituintes derivados do ácido hialurónico ou do ácido retinóico. Na minha pesquisa encontrei uma única solução: *Eucerin Q10 Active*, uma preparação sem óleos, perfumes ou corantes, não comedogénica, que contém coenzima Q10, um antioxidante naturalmente produzido pelo organismo humano cuja quantidade sintetizada vai diminuindo com a idade (a partir dos 20 anos) e que tem a capacidade de neutralizar os radicais livres provenientes dos processos celulares (responsáveis pela degradação de colagénio e elastina). Tem ainda as vitaminas C e E (também antioxidantes) e H (propriedades de fortalecimento da pele).

Para peles de menor sensibilidade, as gamas de custo mais elevado (se possível de adquirir por parte do cliente) poderão ser mais indicadas, uma vez que a maior complexidade da formulação poderá constituir um tratamento de eficácia

mais duradoura. São marcas que se focam no embelezamento da pele, tratando-a simultaneamente. São três as marcas principais:

- A *Lierac*, cujos produtos são à base de extratos vegetais, tendo todos entre os seus constituintes vitaminas, sais minerais e compostos hidratantes e antioxidantes. Caso haja essa possibilidade para o cliente, é muito importante aplicar não só um produto, mas sim uma série de produtos de cuidado múltiplo e integrado. Por exemplo, é aconselhável fazer uma limpeza com uma água micelar, gel ou leite (dependendo do tipo de pele) antes de aplicar o sérum (que irá tratar a pele, tendo o dobro da quantidade de princípio ativo que o creme), e aplicar de seguida o creme (de ação mais superficial, de conforto). Existem ainda produtos destinados a aplicar em alturas particulares do dia, e também em zonas específicas da pele (por exemplo, há produtos diferentes para o contorno dos olhos e para a restante área do rosto). Existem produtos que constituem cuidados semanais ou bissemanais, estando entre eles: a esfoliação (creme esfoliante ou *peeling*), que permite a remoção de células mortas e estimula a renovação celular, permitindo também a aplicação dos restantes produtos em pele que irá realmente absorver os seus constituintes; e as máscaras (purificantes, de conforto, ou de efeito *lifting*), que fazem parte de um tratamento mais intensivo, tendo uma elevada concentração de princípios ativos. Dos cuidados diários fazem parte: a linha de hidratação, a linha de nutrição, as várias linhas anti-envelhecimento, os cuidados específicos (correção de fadiga, de papos e de olheiras), e os cuidados embelezadores (maquilhagem, adelgaçantes). Das linhas anti-rugas fazem parte várias moléculas patenteadas cujo mecanismo de ação previne e/ou diminui o envelhecimento celular. É o exemplo do complexo *D-glyox*, que vai impedir a deposição de açúcares na cadeia de DNA, processo que se descobriu estar ligado ao início do processo de envelhecimento. Existem ainda outros mecanismos de ação envolvidos na ação anti-idade deste tipo de produtos, com é o caso da linha *Coherence LIR*, a qual, para além de conter péptidos estimulantes da produção de colagénio, contém ainda cristais de turmalina, um mineral que vai refletir os raios IV da luz, solar ou artificial, e promover o aquecimento da pele, estimulando os fibroblastos a produzir tanto colagénio como elastina, por forma a minimizar a formação de novas rugas e corrigir outras pré-existentes.

- A *Caudalie*, cuja variedade de produtos é bastante semelhante à marca anterior (maioritariamente cremes, sérums e máscaras em linhas de hidratação, anti-rugas e embelezamento da pele), tendo ainda, adicionalmente, gamas de cuidados adelgaçantes (suplementos alimentares e tisanas) e higiene diária. No

que diz respeito à formulação, a composição é principalmente à base de água, álcool, glicerina, vitamina E e extratos de videira. É desses extratos que é obtido o resveratrol, um polifenol de origem natural com propriedades antioxidantes, que é o principal composto em que aposta a linha anti-envelhecimento. A própria molécula foi transformada em laboratório, por forma a lhe ser adicionada uma maior estabilidade, para que fosse possível uma simplificação da formulação, com uma menor necessidade da adição de conservantes. Da composição dos produtos anti-rugas fazem ainda parte fragmentos de ácido hialurónico estabilizados quimicamente que, pelo seu pequeno tamanho, conseguem penetrar mais profundamente na pele e hidratar as camadas inferiores, não sendo no entanto identificados pelo sistema imunitário como agentes externos agressores, evitando-se desta forma uma reação inflamatória. O mecanismo de ação destes fragmentos passa pela sua capacidade em atrair moléculas de água, promovendo a hidratação e reestruturação celular, atuando sobretudo na prevenção de rugas e no tratamento das rugas de hidratação.

- E a *Filorga*, cujas preparações incluem maioritariamente constituintes sintéticos (de base química), mas também de origem natural (extratos de plantas), dando um maior destaque ao tratamento de peles envelhecidas e/ou com desidratação extrema. Na gama anti-idade, as formulações contêm colagénio e percursoros, lipopéptidos e ácido hialurónico, tanto na própria emulsão como introduzido no interior de nanoesferas, o que permite, simultaneamente, tanto uma libertação imediata como uma libertação prolongada. Dos componentes fazem ainda parte complexos revitalizantes, incluindo enzimas reparadoras da função celular e moduladores da neurotransmissão, e complexos multivitamínicos e minerais.

8.6. Intervenções comunitárias

As intervenções comunitárias são serviços externos prestados pela farmácia, que surgem do desenvolvimento da sua própria atividade, ou são solicitados por outras entidades. Cada intervenção é primeiramente planeada e registada, e será realizada mediante aprovação prévia. Estão incluídas: sessões de informação, programas de rastreio, estudos de avaliação farmacoterapêutica, estudos epidemiológicos, formação nas escolas, etc.¹⁴

Tive a oportunidade de participar num circuito de rastreios na freguesia da Boidobra, que incluiu os temas: podologia, nutrição, dor, sono, pé diabético e

avaliação do risco de diabetes tipo 2. Ficou a meu cargo este último, durante o qual segui um procedimento específico, que incluiu: primeiramente, a medição e registo da glicémia capilar do indivíduo, seguida do fornecimento das devidas informações acerca do valor obtido; depois, caso se tratasse de uma pessoa sem diagnóstico confirmado de diabetes, a aplicação de um questionário de avaliação do risco de vir a desenvolver diabetes tipo 2 nos próximos 10 anos; e, por fim, o aconselhamento acerca das medidas a poderem ser aplicadas em cada caso individualizado. O questionário consistiu de 8 questões acerca dos diversos parâmetros que podem predispor ao desenvolvimento desta doença metabólica (idade, índice de massa corporal, perímetro abdominal, frequência de realização de exercício físico, regularidade em que come vegetais e fruta, medicação para a hipertensão arterial, valores anteriores de glicémia elevados, familiares com diabetes). No final foi obtido um score correspondente às várias categorias de risco. O aconselhamento, de forma geral, consistiu de conselhos acerca da alimentação - que deve ser variada, com ingestão diária de vegetais e fruta, e pouco consumo de comidas ricas em gorduras e açúcares - dando também ênfase à prática de exercício físico regular e a uma regulação periódica dos parâmetros analíticos, principalmente para pessoas com um risco mais elevado. Claro que foi também frisado que a obtenção de um valor de glicémia ocasional acima de 200 mg/dL e/ou de um score elevado no questionário não constitui, por si só, um diagnóstico, sendo importante no aconselhamento de um indivíduo nesta situação dar ainda mais relevância à adoção das medidas referidas, e possível referenciação para um médico.

Noutro circuito de rastreios semelhante, realizado na freguesia do Refúgio, fiquei responsável pelo rastreio do pé diabético. Este rastreio dirigiu-se apenas a indivíduos com diabetes *mellitus* diagnosticada e consistiu na aplicação de um questionário, que incluía: dados biográficos, tipo de diabetes e ano em que foi diagnosticada a doença; tratamento (estilo de vida e/ou terapêutica farmacológica); doenças concomitantes que tenham surgido como consequência da diabetes (nefropatia, retinopatia, doença cardíaca, depressão); frequência e grau de minuciosidade de observação dos pés; lavagem, secagem e hidratação dos pés; existência de calosidades ou outras deformidades, falta de sensibilidade ou formigueiro, dor ou feridas no pé; perceção da temperatura do pé; existência de amputação; calçado; cuidado em relação à proximidade de fontes de calor; corte de unhas; e atitude face ao surgimento de algum problema relacionado com o pé. O objetivo foi, através das respostas ao questionário, perceber a existência ou não da necessidade de direcionamento para uma consulta do pé diabético, assim como fornecer alguns conselhos acerca

de possíveis alterações na atitude do doente diabético face ao cuidado a ter com os pés, frisando sempre a importância da autovigilância.

Tive também a oportunidade de participar num rastreio de avaliação do risco cardiovascular, na freguesia do Tortosendo. Esta avaliação consistiu, para cada indivíduo: primeiramente, na medição do colesterol total, colesterol HDL e triglicérides, assim como da pressão arterial; depois, na aplicação de um questionário que abrangeu questões acerca de hábitos alimentares, horas semanais de exercício físico e sedentarismo, existência de diabetes, hipercolesterolemia ou hipertensão no indivíduo ou familiares próximos, e hábitos tabágicos; e, finalmente, no aconselhamento individualizado de acordo com os parâmetros obtidos e conclusões retiradas das respostas ao questionário. Por fim, recorrendo à norma de “Avaliação do risco cardiovascular SCORE” da DGS, informou-se o indivíduo do seu risco de vir a desenvolver uma doença cardiovascular fatal nos próximos 10 anos. As recomendações consistiram, de forma geral, na adoção de um estilo de vida mais saudável, com uma dieta equilibrada, exercício físico regular, redução do *stress* e cessação tabágica se aplicável, medidas que, em conjunto, deverão contribuir para uma diminuição do risco cardiovascular.

Num outro rastreio, realizado na freguesia de Santa Maria, ficou a meu cargo a iniciativa “Respirar melhor”. Esta consistiu na aplicação de um questionário para a avaliação do grau de controlo de uma patologia respiratória estabelecida ou identificação de sintomas que pudessem alertar para uma possível patologia ainda não diagnosticada. Parte das questões eram mais direcionadas para uma patologia do trato respiratório superior (ex: rinite alérgica), incluindo a frequência, no último mês, da ocorrência de diversos sintomas: nariz entupido, espirros, comichão, corrimento nasal e dispneia. As restantes questões encontravam-se mais direcionadas para uma doença do trato respiratório inferior (ex: asma): pieira, aperto no peito aquando de esforço físico, cansaço no dia-a-dia derivado de sintomas respiratórios, acordar durante a noite devido a esses sintomas e medicação para aliviar os mesmos. A cada resposta correspondia uma pontuação e esse valor iria corresponder, por sua vez, no final, ao que poderia ser considerado um bom ou mau controlo da doença/sintomas. Consoante o resultado obtido, foi fornecido o devido aconselhamento, adaptado para cada caso.

Adicionalmente, aquando de um outro rastreio similar, realizado junto da Polícia de Segurança Pública da Covilhã, fiquei responsável pela determinação da

qualidade do sono da população alvo. Esta intervenção consistiu na aplicação de um questionário que abrangeu perguntas acerca de: duração e horário médios de sono; existência de dificuldade em adormecer ou em permanecer adormecido; presença de sintomas ou manifestações respiratórias noturnas; existência de dores ou perceções exageradas de temperatura que despertem o indivíduo; frequência com que tem pesadelos; toma de medicação para dormir; e perceção subjetiva da própria qualidade de sono, assim como das consequências que um sono pouco reparador tem nas tarefas do dia-a-dia. Parte do questionário era baseado no *Pittsburgh Sleep Quality Index*, pelo que era possível, no final da sua aplicação, obter-se uma pontuação correspondente à qualidade de sono da pessoa em causa (correspondendo uma pontuação menor ou igual a 5 a uma “boa qualidade” de sono e uma pontuação maior que 5 a uma “má qualidade” de sono). Claro que, qualquer que fosse o resultado, cada caso era analisado individualmente e o aconselhamento feito a partir daí dependia também da causa de insónia (caso existisse) percecionada, uma vez que os problemas do sono são geralmente resolvidos quando se descobre e soluciona a causa subjacente (fraco higiene do sono, *stress* emocional, idade, medicação).

Participei, ainda, noutros rastreios semelhantes, assim como em atividades em parceria com escolas primárias.

Decorreu, além disso, durante o mês de março, o projeto de intervenção da farmácia na deteção precoce do cancro colorretal. Esta intervenção consistiu, primeiramente, aquando do atendimento, na sensibilização do público-alvo para a patologia, através do fornecimento de informação acerca dos seus possíveis sinais e sintomas (sangue nas fezes, fadiga, desconforto abdominal, perda de peso, náuseas e vômitos), fatores de risco (idade, fatores genéticos, antecedentes clínicos de cancro ou doenças inflamatórias intestinais, obesidade, estilo de vida sedentário) e medidas preventivas (hábitos alimentares saudáveis, com uma dieta rica em fibras, folatos e cálcio, e com baixo teor de gorduras). Esta intervenção dirigiu-se a indivíduos com idades compreendidas entre os 50 e os 74 anos, sem historial anterior de cancro ou antecedentes familiares, ou diagnóstico prévio de pólipos colorretais ou doenças inflamatórias intestinais. Após frisar a importância de um diagnóstico precoce, para uma maior probabilidade de um tratamento eficaz, foi sugerida a participação no rastreio. Depois da aceitação em participar, foram entregues a cada pessoa três frascos para a colheita das amostras, que posteriormente foram enviadas para um laboratório de análises clínicas para pesquisa de sangue oculto nas fezes (PSOF). Sendo este um possível fator indicador da existência de pólipos colorretais

(lesões benignas do intestino grosso a partir das quais se pode desenvolver um tumor), aos indivíduos que obtiveram um resultado positivo foi feita a referenciação médica, assim como o esclarecimento de qualquer dúvida, frisando sempre o carácter não definitivo do teste (havendo a possibilidade da ocorrência tanto de falsos positivos, como de falsos negativos) e a importância de confirmação por colonoscopia, uma vez que a origem de um sangramento pode ser benigna (por exemplo, no caso da doença hemorroidária). A PSOF é um teste não invasivo e é, desta forma, uma mais-valia, tanto para a farmácia como para a comunidade, a existência deste tipo de intervenções, uma vez que é possível evitar exames mais invasivos como primeira linha de diagnóstico e se consegue, assim, cativar mais facilmente os indivíduos a realizar ações de monitorização do seu estado de saúde. Aos indivíduos que obtiveram um resultado negativo, foi aconselhada a adoção de medidas não farmacológicas de prevenção (estilo de vida) e uma nova realização do teste após um ano.¹⁵

9. Formação contínua

É essencial para qualquer farmacêutico uma constante e contínua atualização de conhecimentos, para que possa dar a melhor resposta a uma realidade que se encontra em permanente mutação. Para as farmácias *Holon*, existe um planeamento anual das formações a serem realizadas (obrigatoriamente) pelos profissionais envolvidos, que é atualizado consoante a necessidade. Entre elas encontram-se formações acerca dos produtos comercializados (ou a comercializar), do atendimento e da liderança.

Tive a oportunidade de efetuar uma formação eletrónica acerca da “*Doença Venosa Crónica (DVC)*”, do *Instituto de Recuperação Vascular de Lisboa*, a realizar no âmbito da comercialização do medicamento de marca *Daflon*, fármaco venotrópico e protetor vascular, cujo princípio ativo é um conjunto de bioflavonoides, e que tem como efeito terapêutico o melhoramento da circulação sanguínea, promovendo a tonicidade e elasticidade das veias. A DVC surge de uma dificuldade na circulação venosa, ou seja, no retorno do sangue das veias para o coração, associada a uma forte reação inflamatória da zona.

A DVC ocorre principalmente nos membros inferiores. Temos como exemplos de patologias as telangiectasias, as úlceras venosas e as veias varicosas. No âmbito da fisiopatologia, pode existir apenas obstrução das válvulas venosas, ou também lesão valvular, que irá provocar refluxo sanguíneo. As causas da

alteração do fluxo sanguíneo podem ser diversas, sendo algumas: a predisposição genética, a adoção de uma posição ortostática prolongada, fatores hormonais (alterações, contração, gravidez), obesidade, falta de exercício físico, idade, roupas apertadas e ambientes quentes. Esta doença é caracterizada por uma elevada prevalência e elevados custos de tratamento, podendo, pelo elevado impacto na qualidade de vida do doente, levar à suspensão/cessação da atividade profissional. É uma doença que afeta mais mulheres do que homens, e os sintomas e sinais dos membros inferiores consistem em: peso, cansaço, dor, edema, câibras, sensação de picadas e ardor, prurido, rubor e parestesias. A dor aparece em fases precoces, sendo mais semelhante a uma dor visceral (dispersa, pouco objetivável, muito desagradável, elevado impacto emocional) que a uma dor cutânea (mais superficial, localizada e suave, comparativamente). Todos estes sinais e sintomas têm um carácter evolutivo, sendo essencial a prevenção e o tratamento precoce. Como os sintomas são agravados pelo calor e com o decorrer do dia, deve-se aconselhar o doente a elevar e/ou descansar os membros sempre que possível, assim como passar as pernas por água fria no final do banho, ações que aliviam o desconforto. O tratamento pode consistir de fármacos flebotómicos e/ou uso de meias ou ligaduras elásticas. Deve-se aconselhar ainda ter cuidados diários com a pele (ex: hidratação).

Um outro tipo de DVC é a doença hemorroidária, que resulta da inflamação e degradação dos vasos sanguíneos que irrigam a região anal, podendo levar a hemorragias. Pensa-se que a principal causa desta patologia seja a existência de uma pressão abdominal exagerada, derivada das mais diversas situações, tais como: obstipação, vida sedentária, ingestão de álcool, gravidez ou consumo de comida picante. É uma doença que tem um elevado impacto na qualidade de vida e que, se não for tratada precocemente, irá evoluir, tornando-se cada vez mais dolorosa e aumentando o risco da ocorrência de crises repetidas. No entanto, é difícil existir um diagnóstico prematuro, pois muitas vezes existe um sentimento de vergonha por parte dos doentes. É muito importante salientar a necessidade de uma boa comunicação entre o doente e o profissional de saúde, sendo que este último deve ter uma atitude que permita ao doente sentir o menor constrangimento possível para expor a sua situação. O tratamento passa principalmente pelo uso de fármacos flebotómicos, embora possa existir um alívio temporário dos sintomas com o uso de cremes, pomadas e supositórios analgésicos (não tendo, contudo, eficácia a longo prazo). A prevenção de crises passa por ações que minimizem a agressão à região afetada, assim como pela ingestão de fibras e muita água e fazer exercício físico regular.

10. Apreciação global do período de estágio

Fazendo uma apreciação retrospectiva do meu estágio em farmácia comunitária, penso poder classificá-lo como uma experiência positiva, que me fez crescer em conhecimento, capacidade de comunicação e autonomia. Aprendi muito no que diz respeito ao saber farmacêutico, à prática farmacêutica e, principalmente, ao que realmente significa ser farmacêutico. Num mercado crescente de terapias à disposição do utente, é cada vez mais necessária a presença ativa do farmacêutico no contexto da deteção, prevenção e cura das patologias, através da prestação do melhor aconselhamento possível. Espero continuar a ver a valorização gradual da profissão, pois acho realmente essencial o contributo que podemos dar à ciência e à saúde.

Capítulo 2 - Síntese de derivados da estrona funcionalizados nos anéis C e D como potenciais agentes anti-cancerígenos

1. Introdução

1.1. Esteroides: generalidades e biossíntese endógena

Hoje em dia, os esteroides são utilizados para o tratamento de inúmeras doenças: infecções, insuficiências adrenocorticais, doenças inflamatórias, alergias, neoplasias, etc. Estes são compostos orgânicos cuja estrutura geral é composta por 4 anéis de carbono, denominados de A a D. A esta estrutura dá-se o nome de ciclopentanoperhidrofenantreno (figura 6).¹⁶

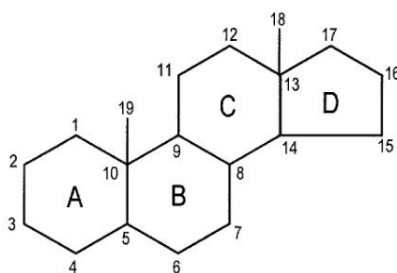


Figura 6 - Esqueleto estrutural geral de moléculas esteroides (nomeadamente um derivado androstano, com respetiva numeração de carbonos).

Todas as hormonas esteroides ativas têm um precursor comum: o colesterol. São produzidas principalmente nas glândulas adrenais, gónadas e placenta. As enzimas envolvidas na sua síntese pertencem a uma de duas classes: citocromo P450 (CYP450) ou hidroxisteroide desidrogenases (figura 7).¹⁷

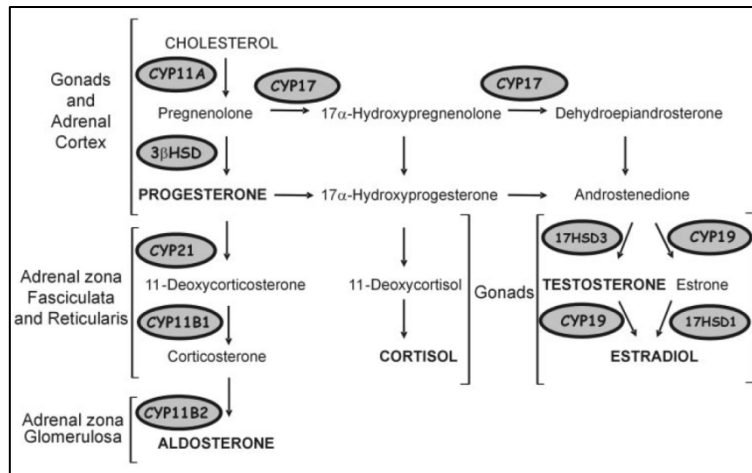


Figura 7 - Síntese de hormonas esteroides nas glândulas adrenais e gónadas.

As enzimas CYP450 catalisam a hidroxilação e clivagem do substrato esteroide, funcionando como monooxigenases e utilizando a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH) como dadora de eletrões ao oxigénio molecular, sendo a reação geral: $RH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow ROH + H_2O + NADP^+$. São diversos os subtipos de enzimas CYP450 envolvidos na biossíntese de esteroides. Aqui serão destacados aqueles que, direta ou indiretamente, estão envolvidos na síntese das moléculas de que trata o trabalho experimental levado a cabo.

O CYP11A catalisa o primeiro passo da biossíntese de todas as hormonas esteroides. Esta enzima irá converter o colesterol em pregnenolona (e isocaproaldeído) (figura 8). No organismo humano, a expressão desta enzima é predominante no córtex adrenal, ovários, testículos e placenta.

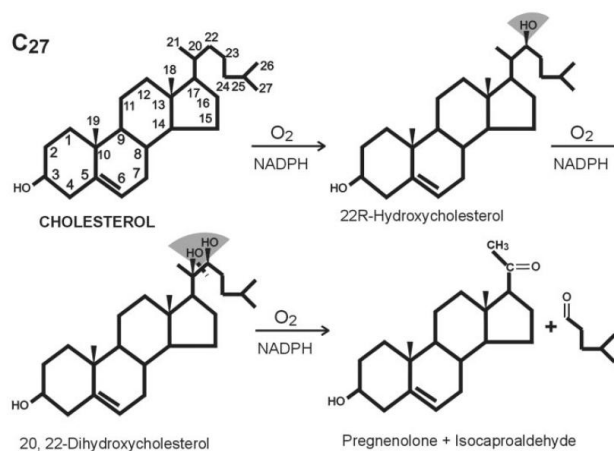


Figura 8 - Conversão da molécula de colesterol em pregnenolona e isocaproaldeído pelo CYP11A (e respetivos produtos e passos intermédios).

O CYP17 catalisa duas reações de oxidação distintas: a 17 α -hidroxilação da pregnenolona e da progesterona, e a clivagem em C17-20 do produto obtido, para, respetivamente, dar origem a desidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenodiona (conjuntamente com acetaldeído) (figura 9). No ser humano, a expressão desta enzima é predominante nas glândulas adrenais.

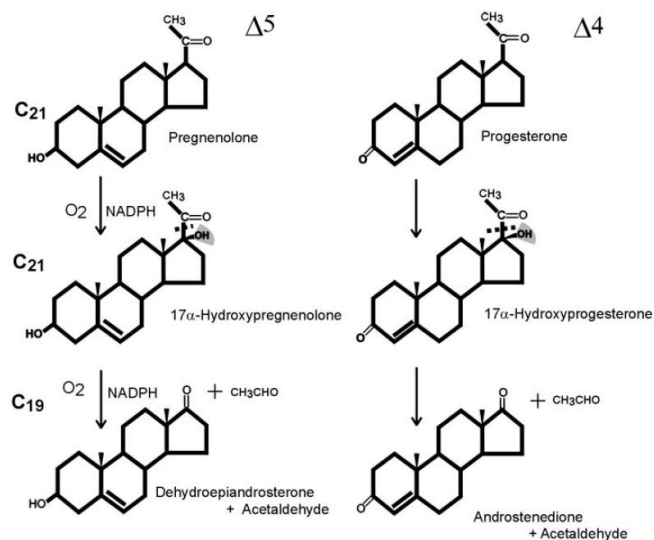


Figura 9 - Conversão das moléculas de pregnenolona e progesterona em, respetivamente, DHEA e acetaldeído, e androstenodiona e acetaldeído pelo CYP17 (e respetivos produtos e passos intermédios).

O CYP19, também conhecido como P450 aromatase, catalisa a conversão de androstenodiona e testosterona em, respetivamente, estrona (figura 10) e estradiol. Embora esteja amplamente distribuída, a expressão desta enzima no organismo humano é predominante nos ovários, testículos e placenta. ¹⁷

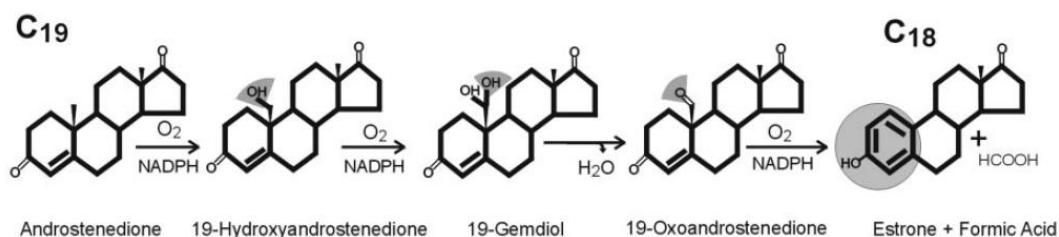


Figura 10 - Conversão da molécula de androstenodiona em estrona e ácido fórmico pelo CYP19 (e respetivos produtos e passos intermédios).

Estão incluídas na classe das hidroxisteroide desidrogenases as enzimas 3 β -hidroxisteroide desidrogenases (3 β HSD) e 17 β -hidroxisteroide desidrogenases (17 β HSD). Estas estão envolvidas na redução/oxidação das hormonas esteroides e utilizam como co-fatores NADPH ou NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reduzida).

A enzima 3 β HSD tem várias isoformas. Estas localizam-se nas membranas celulares das mitocôndrias ou dos microsomas, dependendo do tipo de célula de que se trata. A sua ação é essencial para a produção de todas as hormonas esteroides ativas. No organismo humano conhece-se a ação das isoformas I e II, sendo ambas desidrogenases/isomerases, catalisando a conversão de pregnenolona, 17 α -hidroxipregnenolona e DHEA a, respetivamente, progesterona, 17 α -hidroxiprogesterona e androstenodiona (figura 11). A expressão das isoformas difere, sendo que a 3 β HSD I tem maior expressão na placenta, pele e tecido mamário e a 3 β HSD II tem maior expressão na glândula adrenal, ovários e testículos.¹⁷

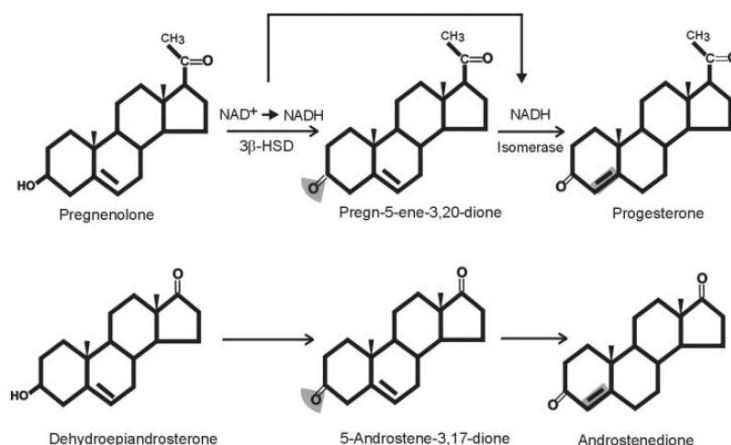


Figura 11 - Conversão das moléculas de pregnenolona e DHEA em, respetivamente, progesterona e androstenodiona pela 3 β HSD (e respetivos produtos e passos intermédios).

O papel da 17 β HSD é também essencial, catalisando o passo final da biossíntese das hormonas esteroides ativas testosterona e estradiol. Ao contrário das enzimas anteriormente faladas, a 17 β HSD participa apenas na síntese localizada nas gónadas, e não na síntese adrenal. Pode estar sob a forma solúvel ou acoplada às membranas. Mediante a sua ação dá-se a conversão (redução) da forma inativa, 17-ceto, para a forma ativa, 17 β -hidroxi.

Existem várias isoenzimas da 17βHSD. Até à data foram isoladas 11, cujas características diferem bastante entre si: distribuição tecidual, preferências catalíticas, especificidade de substrato, localização subcelular e mecanismos de regulação, que são diferentes e específicos para cada isoenzima. Nas gónadas, participam na biossíntese de hormonas esteroides as isoenzimas 1, 3 e 7 (figura 12).

A 17HSD1 catalisa a conversão de estrona a 17β-estradiol, preferindo NADPH como co-fator, tendo maior expressão nos ovários e na placenta.

A 17HSD7 catalisa também a conversão de estrona a 17β-estradiol, sendo também NADPH o co-fator preferido. A produção de estradiol nos ovários está dependente da ação desta enzima, sendo predominante neste local (exceto em mulheres grávidas, situação em que está ausente).

A 17HSD3 catalisa a conversão de androstenodiona a testosterona, preferindo NADPH como co-fator. Tem expressão única e exclusiva nos testículos.

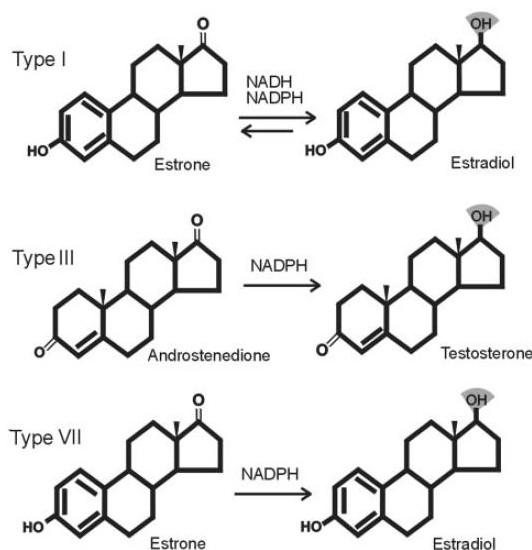


Figura 12 - Ação das várias isoenzimas da 17βHSD: conversão da molécula de estrona a 17β-estradiol pela 17HSD1, conversão da molécula de androstenodiona a testosterona pela 17HSD3, e conversão da molécula de estrona a 17β-estradiol pela 17HSD7.

A expressão da maioria destas enzimas não se restringe aos locais supramencionados, podendo existir também uma elevada expressão noutros tecidos. É o caso, por exemplo, da elevada expressão de 17HSD1 no tecido

mamário e no endométrio ou da elevada expressão periférica de CYP19, essencial para converter androgénios em estrogénios no tecido adiposo. Recentemente foi descoberta ainda a síntese *de novo* de diversas hormonas esteroides no sistema nervoso e cardíaco, sendo detetadas também as enzimas envolvidas.¹⁷

No que diz respeito à localização dos recetores esteroides, mais especificamente dos recetores estrogénicos (os mais importantes para o contexto do presente trabalho de investigação), pode dizer-se que têm uma vasta distribuição no organismo humano, diferindo consoante o tipo de recetor: α ou β . Enquanto que os recetores estrogénicos α predominam no endométrio, na mama e em células endoteliais vasculares e do músculo liso, os recetores β existem maioritariamente na próstata, testículos, ovários, útero, bexiga, pulmões, cérebro e vasos sanguíneos.¹⁸

O principal mecanismo de ativação deste tipo de recetores é genómico, que ocorre no caso de os recetores estarem localizados no núcleo. Tal como os restantes recetores de hormonas esteroides, os recetores estrogénicos funcionam, neste caso, como fatores de transcrição, que ativam a expressão de certos genes. Após a ligação de moléculas estrogénicas, é ativada toda uma cascata de sinalização, que irá despoletar a resposta fisiológica. Adicionalmente, existe ainda um outro tipo de mecanismo de ativação, o mecanismo não genómico, que ocorre quando os recetores estrogénicos estão localizados na membrana plasmática, ou imediações, e no qual há uma ativação da resposta celular pela elevação da concentração de iões (Ex: Ca^{2+} ou NO), que por sua vez irá despoletar a cascata de sinalização.¹⁹

Os estrogénios, como hormonas que são, têm um papel preponderante em diversos processos fisiológicos, tais como: na reprodução, onde regulam a ovulação e o restante ciclo reprodutor feminino; na saúde cardiovascular, onde têm um papel protetor, diminuindo o risco de aterosclerose e lesão vascular, e estimulando a angiogénese e proliferação das células endoteliais vasculares e do músculo liso e cardíaco; na integridade óssea, diminuindo a reabsorção de Ca^{2+} para a corrente sanguínea e a formação de osteoclastos; e nas funções cognitivas e comportamentais, onde têm um efeito neuroprotetor e participam na aprendizagem e memória, assim como na modulação do humor, do comportamento e das emoções.¹⁸⁻²²

1.2. Cancro: o porquê da necessidade de novas terapias

O cancro é uma doença potencialmente fatal que, embora esteja tendencialmente a diminuir no que respeita a incidência e mortalidade nos países desenvolvidos, afeta ainda um elevadíssimo número de indivíduos, sendo, para os EUA, a segunda principal causa de morte tanto em adultos (a seguir às doenças cardiovasculares) como em crianças (a seguir a acidentes). Apesar de os avanços científicos terem levado a que hoje seja possível aumentar a esperança de vida e até, em alguns casos, provocar a remissão da doença, está ainda longe de existir uma terapia ideal, com uma certeza de cura e efeitos secundários mínimos.²³ É, assim, de elevada importância continuar à procura de novas moléculas que possam dar origem a novas e melhores terapêuticas.

Em geral, um tumor pode ser caracterizado como um conjunto de células de proliferação desregulada e apoptose reduzida. Esta massa celular vai ocupar o espaço e utilizar os nutrientes e o oxigénio destinados e necessários à sobrevivência das células envolventes, o que, mais tarde ou mais cedo, vai conduzir a uma falência orgânica e, eventualmente, à morte do próprio indivíduo, caso o crescimento tumoral não seja parado a tempo.

As terapias atuais de combate ao cancro, aplicadas como monoterapia ou em combinação (mais frequente, especialmente para cancros em estado mais avançado) consistem em: cirurgia (para remoção da massa tumoral, sendo conservativa ou não, podendo proceder-se também à dissecação dos nódulos linfáticos adjacentes à massa tumoral para um melhor prognóstico), quimioterapia, terapia hormonal, radioterapia e terapia biológica. No entanto, cada uma destas terapias apresenta uma série de efeitos adversos possíveis e outros obstáculos, que podem levar a uma não-adesão terapêutica ou, no caso de o regime ser aceite pelo doente, a uma diminuição significativa da qualidade de vida.²⁴ Ora vejamos cada caso em particular.

No que diz respeito à cirurgia, esta pode não ser aceite pelo doente, por, por exemplo, uma questão de imagem corporal e autoestima, ou pode até estar contraindicada, para além de que não há uma certeza absoluta de que toda a massa tumoral seja removida; ademais, a dissecação de nódulos linfáticos pode levar uma série de morbilidades, como, por exemplo, o desenvolvimento de linfedema.²⁴

No caso da quimioterapia, esta tende a ser bastante agressiva, pelo que, tomando como exemplo o fármaco cisplatina (muito usado, por exemplo, para o cancro ovárico e testicular), pode levar a neurotoxicidade, nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos (podendo-se generalizar a maioria destes efeitos para outros fármacos citostáticos). Estes efeitos são, na sua maioria, derivados da produção de espécies reativas de oxigénio e danos no DNA das células dos órgãos afetados pela toxicidade deste tipo de terapia.²⁵ Para além disso, apesar de uma resposta inicial favorável ao tratamento, a maioria dos pacientes adquire resistência a este tipo de terapia com o passar do tempo, pelo facto das células tumorais serem capazes de escapar, por diversos mecanismos (Ex: aumento da atividade dos transportadores de efluxo, redução da atividade dos transportadores de *uptake*), ao efeito citotóxico da quimioterapia, não só para um único agente, mas para vários (multirresistência), levará a uma falha terapêutica inevitável.²⁶

No que diz respeito à terapia hormonal, tomando como exemplo a terapia para o cancro da mama: os moduladores seletivos dos recetores estrogénicos (SERM's) mais antigos, como, por exemplo, o tamoxifeno, podem levar a uma elevação no risco de ocorrência de tromboembolismo e cancro do endométrio, e os mais recentes, como, por exemplo, o raloxifeno, embora já tenham um risco menos elevado, que, no entanto, continua presente, apresentam uma redução significativa de potência farmacológica; os inibidores da aromatase (AI's) podem causar sintomas gastrointestinais (náuseas, vômitos, diarreia), tromboembolismo, sangramento vaginal e redução das funções cognitivas; e tanto SERM's como AI's podem causar ainda afrontamentos, ganho de peso, disfunção sexual e osteoporose (efeitos derivados, na sua maioria, da privação estrogénica).²⁷

No caso da radioterapia, há uma possibilidade de irradiar, não só a massa tumoral, mas também os tecidos saudáveis adjacentes, podendo resultar em, por exemplo, para a irradiação de uma massa tumoral prostática, toxicidade gastrointestinal, complicações geritourinárias e disfunção erétil.²⁸

E, finalmente, no caso da terapia biológica, esta apresenta um elevado risco de desenvolvimento de problemas cardiovasculares.²⁴

Posto isto, sendo que muitas associações terapêuticas levam a que, para além da sinergia de efeitos desejados, haja também uma sinergia e acumulação de efeitos adversos, é de extremo relevo o desenvolvimento de novas terapias com

uma maior seletividade de ação e um potencial mínimo de efeitos adversos. Embora os efeitos adversos só possam ser realmente estudados posteriormente, em ensaios pré-clínicos e clínicos, o primeiro passo passará sempre pela conceção e síntese molecular.

No que diz respeito aos mecanismos de ação principais da terapia anti-tumoral farmacológica, estes podem ser agrupados em quatro categorias diferentes: inibição/modulação de recetores hormonais, inibição/modulação enzimática, indução da apoptose/inibição da angiogénese e citotoxicidade.²⁹

Muitos cancros são hormono-dependentes, sendo o crescimento do tumor estimulado por estrogénios e/ou androgénios endógenos.²⁹ O cancro da mama, por exemplo, que atinge principalmente mulheres pós-menopausa, é maioritariamente estrogénio-dependente. Os estrogénios são moléculas de extrema importância em diversos processos biológicos do corpo humano. Deste modo, as suas características e propriedades têm vindo a ser estudadas ao longo dos anos, tendo também vindo a ser sintetizados em laboratório um grande número de derivados, de modo a se poder investigar o seu efeito numa grande variedade de patologias e condições médicas.³⁰

Dentro das terapias atuais de combate ao cancro, a terapia hormonal tem tido grande destaque pela sua eficácia e efeitos adversos reduzidos, por exemplo, em comparação com a quimioterapia clássica.³¹ Este tipo de terapia inclui maioritariamente inibidores da biossíntese e da ação de hormonas esteroides, sendo constituída habitualmente por compostos com esqueleto base esteroide. Utilizada complementarmente à cirurgia (ooforectomia, adrenalectomia, hipofisectomia), a terapia hormonal é hoje em dia uma estratégia de combate à doença muito importante, sendo considerada como opção para a grande maioria das doentes.^{27,31,32}

1.3. Modificações nos anéis C e D da estrona com potencial interesse anti-tumoral

Muito antes de serem equacionados como possíveis agentes anti-tumorais, vários esteroides da série estrano faziam já parte de alguns métodos contraceptivos, existindo diversos contraceptivos orais no mercado que são seus derivados. É o caso da mifepristona e de alguns dos seus análogos, que são obtidos a partir da estrona, dando origem a análogos da molécula, principalmente com variações em

C17. Geralmente são estes análogos, por terem um substituinte na posição 17, nomeadamente um grupo α -etinil, que são os gestagénios mais potentes.³³ No entanto, a ausência desse grupo não implica necessariamente uma perda de potência se tivermos outros substituintes nessa ou noutras posições da molécula que possam dar origem a derivados igualmente potentes, ou até mesmo de potência superior. É o caso dos derivados 11 β -nitrooxi.

A nitrooxidação deverá dar origem a estrogénios de potência superior. O efeito destes estrogénios modificados no anel C como anticoncepcionais (inclusive na contraceção de emergência) está já bastante estudado, sendo que está descrita uma ação anticoncepcional superior quando comparada com a dos estrogénios mais comumente utilizados, como o etinilestradiol (um dos anticoncepcionais mais potentes no mercado), sendo por isso necessária uma menor quantidade para um efeito semelhante, diminuindo a intensidade e o risco de efeitos adversos (como o cancro do endométrio ou o cancro da mama).

Para a atividade anti-fertilidade, é sugerido que o efeito estrogénico surja da ligação do composto 11 β -nitrooxidado a recetores estrogénicos uterinos. De facto, foi observado por Peters *et al* a ligação deste derivado da estrona ao recetor citosólico uterino (RCU) de ratos em ensaios *in vivo*. Este mecanismo de ação parece ser semelhante ao também observado em derivados com um grupo 11 β -metoxi, o que sugere uma elevada relevância destes substituintes em C-11 para a ligação ao RCU (figura 13).³⁴

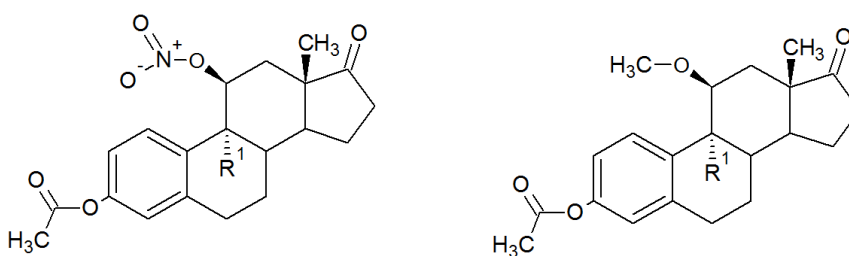


Figura 13 - Estruturas químicas dos derivados do acetato de estrona 11 β -nitrado (esquerda) e 11 β -metoxi (direita); R¹ = OH.

Estes derivados nitrados também parecem ter propriedades anti-tumorais. De facto, alguns trabalhos já publicados sugerem que, *in vivo*, poderá ocorrer a libertação de óxido nítrico, um conhecido agente citotóxico, a partir do nitrooxi-esteróide, sendo este o mecanismo hipotético de ação anti cancerígena. Os resultados obtidos para diversos derivados da estrona nitrados - estrona,

acetato de estrona, 17-oxima e oxima diacetato (figura 14) - sugerem propriedades anti cancerígenas confirmadas em mais que um modelo de ensaios *in vivo*. Neste contexto, Rzheznikov *et al* registaram que todos os compostos tinham propriedades terapêuticas em murganhos com adenocarcinoma da mama Ca-755 e no modelo alveolar do cancro da mama RMK-1 (modelo em que existe uma maior sensibilidade dos recetores). Neste último modelo não existiram diferenças significativas entre os compostos, no entanto no modelo de adenocarcinoma os derivados nitrados com o grupo hidroxilo fenólico livre tiveram um efeito mais pronunciado do que os correspondentes acetatos.³⁵

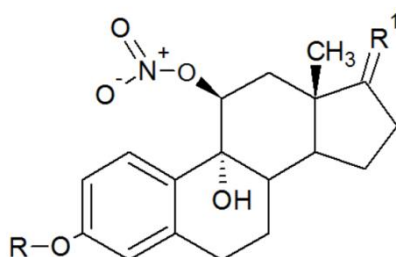


Figura 14 - Estrutura química base de derivados da estrona nitro-oxidados: estrona, acetato de estrona, 17 oxima e oxima acetato. R = H (estrona) ou Ac (acetato de estrona); R¹ = O (estrona e acetato de estrona), NOH (17-oxima) ou NOAc (oxima acetato).

Assim, para além de, aparentemente, a presença do grupo 17 α -etinil anteriormente referido não ser necessária para uma boa atividade oral estrogénica e potência terapêutica é, inclusive, vantajosa a sua ausência, uma vez que está comprovado que causa hepatotoxicidade.³⁶

Outra família de compostos relevantes para o presente estudo são as lactonas no anel D de esteroides, existindo, nomeadamente, a estrolactona. A primeira síntese da estrolactona data dos anos 40, quando Westerfeld tentava decifrar os mecanismos metabólicos de degradação da estona no organismo humano, utilizando uma oxidação com peróxido de hidrogénio diluído, esperando que este degradasse o anel fenólico. Mas, na verdade, o que aconteceu foi a degradação do anel D da molécula, com a oxidação do grupo carbonilo e produção de um hidroxiácido, que rapidamente perdeu uma molécula de água e causou a regeneração do anel, formando assim uma lactona. A molécula produzida foi testada e demonstrou atividade estrogénica *in vivo*, tendo apenas 1/14 da potência da estrona.³⁷ Mais tarde, foi também demonstrado o seu papel no aumento da produção das hormonas gonadotrópicas e adrenotrópicas pelo

estímulo da glândula hipofisária, assim como citotoxicidade *in vitro* em culturas de células tumorais. ^{38,39}

No âmbito da pesquisa efetuada, constatou-se que, tanto para estrolactona como para o seu derivado acetilado, pouco se sabe acerca dos mecanismos específicos de citotoxicidade. O único mecanismo específico conhecido foi comprovado para o derivado metilado da molécula, a estrolactona-3-metilo (figura 15), e consiste na redução da recaptação de timidina por culturas celulares HeLa S3 (células de cancro cervical), o que poderá comprometer a síntese de DNA, inibindo, desta forma, a proliferação da massa tumoral. ⁴⁰

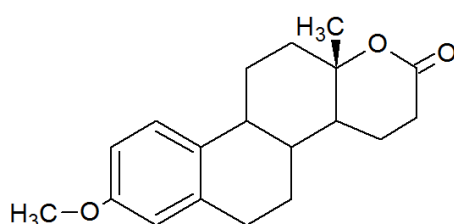


Figura 15 - Estrutura química da molécula de estrolactona-3-metilo.

No entanto, existem dados relativos a outras moléculas esteroides de estrutura semelhante, sendo que a partir dos seus mecanismos de ação poderemos extrapolar um possível modo de atuação. Por exemplo, num trabalho publicado recentemente, foi descrito que a D-homoestrona (figura 16) que, embora não seja uma lactona, tem uma estrutura bastante semelhante à estrolactona, leva à indução da apoptose em células tumorais, induzindo a paragem do crescimento celular na fase G2, ativando a via intrínseca da apoptose com disrupção da formação dos microtúbulos e conseqüente morte celular. ^{[v]41}

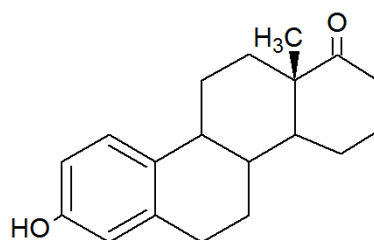


Figura 16 - Estrutura química da molécula de D-homoestrona.

Uma outra modificação do esqueleto da série estrano que parece diminuir a estrogenicidade molecular é a introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11. Estudos realizados por Palomino *et al* sugerem que esta introdução irá diminuir a ligação da molécula de estradiol ao recetor estrogénico humano para 1/5 do valor original.⁴²

2. Objetivos

O presente trabalho de investigação experimental tem como principais objetivos o desenvolvimento e a avaliação biológica de esteroides da série estrano com potencial atividade anti-tumoral, nomeadamente derivados da molécula de estrona funcionalizados nos anéis C e D.

Na etapa inicial do projeto, correspondente à síntese química, pretende-se numa primeira fase proteger o grupo hidroxilo em C3, grupo químico de elevada reatividade, recorrendo a uma acetilação, sintetizando assim uma molécula de partida protegida nesta posição, permitindo que as restantes reações produzam alterações nas posições pretendidas e teoricamente previstas.

Seguidamente, tenciona-se investigar o efeito do alargamento do anel D, mediante a formação de uma lactona, na atividade biológica. Adicionalmente, o efeito da introdução de um grupo nitrooxi em C11B e de um grupo hidroxilo em C9 α na atividade dos derivados da molécula de estrona será também estudada, bem como da combinação desta modificação com a formação de uma lactona no anel D, pretendendo-se desenvolver compostos com ação anti-tumoral e sem efeitos estrogénicos, o que se poderá conseguir combinando estas duas funcionalidades.

Além disso, o efeito da introdução de uma dupla ligação em C9-C11 na proliferação de células tumorais e não tumorais será também explorado.

Após a fase de síntese, pretende-se elucidar quais das moléculas produzidas têm atividade anti-tumoral a nível celular e, se sim, a que concentrações provocam esse efeito.

3. Parte experimental

3.1. Síntese química

3.1.1. Materiais e equipamentos

Para a experimentação laboratorial foi utilizado material diverso: material corrente de laboratório; aparelho de ultrassons *Branson 5800*; balança analítica *KERN ABS* (e = 1 mg, d = 0,1 mg); câmara de raios ultravioleta *Vilber Lourmat*; espectrofotómetro IV Nicolet iS10, Thermo Scientific; espectrofotómetro RMN Bruker Avance III 400; evaporador rotativo Buchi Switzerland; exsiccador P Selecta; hotte Laborsystem; placas comerciais de sílica gel 60 com indicador fluorescente UV254 para cromatografia em camada fina (CCF) Macherey-Nagel; sistema de vácuo para filtração.

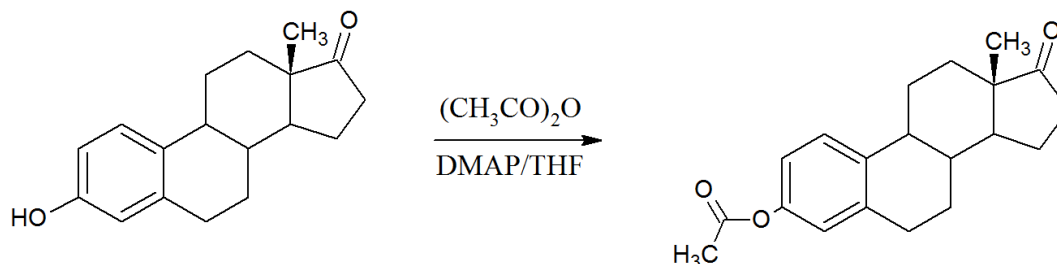
3.1.2. Reagentes e solventes

Foram utilizados variados compostos, adquiridos comercialmente a diversos fabricantes: acetato de etilo (l, *Fisher Chemical*), acetonitrilo (l, *Fluka*), ácido acético glacial (l, *Chem-Lab NV*), ácido benzenoselenínico (s, *Sigma-Aldrich*), ácido clorídrico (l, *Fisher Chemical*), ácido *m*-cloroperoxibenzóico (s, *Sigma-Aldrich*), ácido sulfúrico (l, *Panreac*), água oxigenada (l, *Sigma-Aldrich*), anidrido acético (l, *Sigma-Aldrich*), azoto industrial (g, *ARLÍQUIDO Lda*), bicarbonato de sódio (s, *Sigma-Aldrich*), carbonato de potássio anidro (s, *Fisher Chemical*), cloreto de bismuto III (s, *Sigma-Aldrich*), cloreto de lítio (l, *AppliChem*), cloreto de sódio (s, *Fisher Chemical*), clorofórmio deuterado (l, *Sigma-Aldrich*), diclorometano (l, *Fisher Chemical*), 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ) (s, *Sigma-Aldrich*), 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (s, *Fluka*), dimetilsulfóxido (DMSO) deuterado (l, *Sigma-Aldrich*), estrona (s, *Cayman Chemical Company*), éter de petróleo 40-60°C (doravante designado neste documento apenas por éter de petróleo) (l, *Chem-Lab NV*), éter dietílico (l, *Panreac*), hidróxido de potássio (s, *Chem-Lab NV*), hidróxido de sódio (s, *Sigma-Aldrich*), metanol (l, *Fisher Chemical*), monoperoxiftalato de magnésio hexahidratado (MMPP) (s, *Sigma-Aldrich*), nitrato de amónio e cério (s, *Sigma-Aldrich*), piridina (l, *Fisher Chemical*), sílica gel 60A 0,060-0,200 mm e 0,035-0,070 mm (s, *Acros Organics*), sulfato de sódio anidro (s, *Panreac*), sulfito de

sódio (José M. Vaz Pereira, S.A.), *tert*-butil-hidroperóxido 5.0-6.0M em *n*-decano (l, Sigma-Aldrich), tetrahidrofurano (THF) (s, Sigma-Aldrich).

3.1.3. Sínteses químicas

3.1.3.1. Síntese de acetato de estrona⁴³



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 1 mmol (0,2704 g) de estrona em 5,4 mL de THF. A esta solução adicionaram-se 0,0945 mL de anidrido acético e 0,0300 g de DMAP.

A reação terminou ao fim de 4 horas, obtendo-se apenas uma mancha de produto, com um valor de R_f = 0,90, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observada a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

O THF foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x50 mL de diclorometano, lavando-se depois a fase orgânica com 15 mL de HCl 10%, 15 mL de uma solução saturada de NaHCO₃ e 25 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido foi um sólido amorfo de cor beje, que foi posto a secar na estufa de vácuo.

O rendimento final obtido foi de 94%.

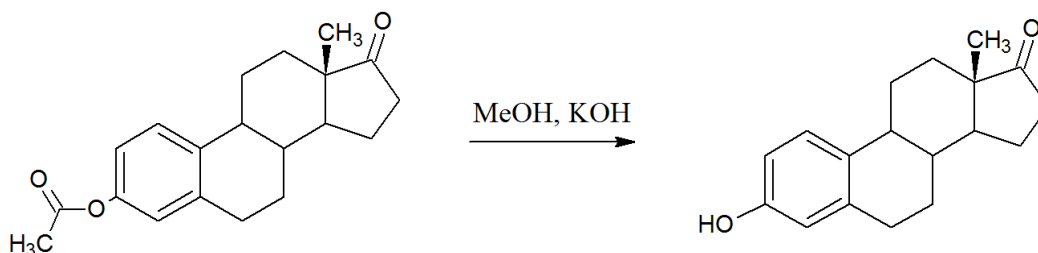
A análise por ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) mostrou os seguintes picos principais: δ 0,84 (3H, s, H18), 2,21 (3H, s, CH_3CO), 6,74 (1H, d, H4), 6,78 (1H, dd, H2), 7,20 (1H, d, H1).

A análise por ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) mostrou os seguintes picos: δ 14,03, 21,33, 21,79, 25,94, 26,54, 29,60, 31,75, 36,06, 38,19, 44,35, 48,15, 50,63, 118,96, 121,80, 126,62, 137,61, 138,22, 148,76, 170,05 (CH_3CO), 221,00 (C^{17}).

A análise por IV (cm^{-1}) mostrou os seguintes picos mais relevantes: 1008, 1201, 1735, 1761, 2861, 2931, 2964.

3.1.3.2. Hidrólise do acetato de estrona

3.1.3.2.1. Hidrólise utilizando KOH ⁴⁴



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,25 mmol (0,0781 g) de acetato de estrona em 1,31 mL de metanol. A esta solução adicionaram-se 0,0650 g de KOH.

A reação terminou ao fim de 30 minutos, como observado pela obtenção de uma única mancha de produto (mostrando a ausência do substrato inicial) com um $R_f = 0,26$ em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 1:4], observada a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C .

O metanol foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. Depois adicionou-se HCl 5% até neutralizar o pH e 10 mL de água destilada previamente à extração. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x40 mL de acetato de etilo, lavando-se no fim a fase orgânica com 20 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi

evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido foi um sólido cristalino de cor branca, que foi posto a secar na estufa de vácuo.

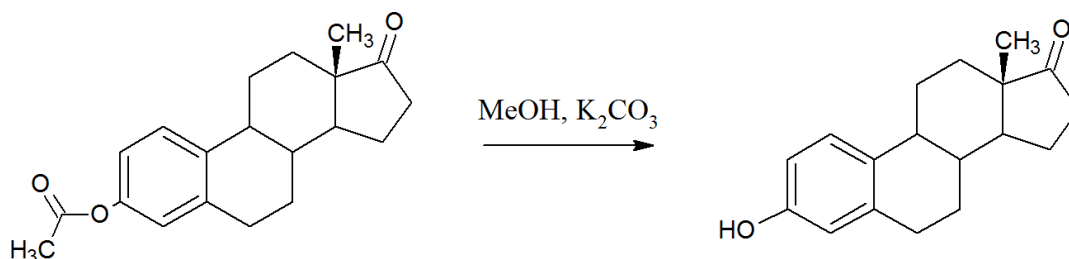
O rendimento final obtido foi de 89%.

A análise por ^1H RMN (DMSO, 400 MHz) mostrou os seguintes picos principais: δ 0,89 (3H, s, H18), 6,52 (1H, s, H4), 6,57 (1H, dd, H2), 7,11 (1H, d, H1), 9,07 (1H, s, OH).

A análise por ^{13}C RMN (DMSO, 100 MHz) mostrou os seguintes picos mais significativos: δ 13,99, 21,60, 26,02, 26,60, 29,52, 31,83, 35,84, 38,43, 43,92, 47,80, 50,06, 113,26, 115,42, 126,53, 130,38, 137,58, 155,48 (C^{17}), 220,16 (CH_3CO).

A análise por IV (cm^{-1}) mostrou os seguintes picos mais significativos: 1705, 2860, 2872, 2936, 3275.

3.1.3.2.2. Hidrólise utilizando K_2CO_3 ³⁰



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,25 mmol (0,0781 g) de acetato de estrona em 2,36 mL de metanol. A esta solução adicionaram-se 0,1575 g de K_2CO_3 .

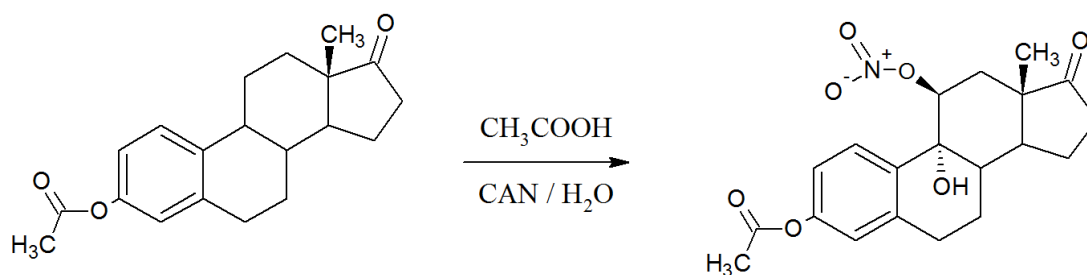
A reação terminou ao fim de 1 hora e 30 minutos, como observado pela obtenção de uma única mancha de produto (mostrando a ausência do substrato inicial) com um $R_f = 0,35$ em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 1:4], observada a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C .

O metanol foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. Depois adicionou-se HCl 5% até neutralizar o pH e 10 mL de água previamente à extração. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x20 mL de acetato de etilo, lavando-se no fim a fase orgânica com 20 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido foi um sólido cristalino de cor branca, que foi posto a secar na estufa de vácuo.

O rendimento final obtido foi de 97%.

A análise por ¹H RMN (DMSO, 400 MHz), ¹³C RMN (DMSO, 100 MHz) e IV mostrou dados similares aos descritos na secção 3.1.3.2.1.

3.1.3.3. Nitro-oxidação do acetato de estrona ³³



Dissolveu-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 1 mmol (0,3146 g) de acetato de estrona em 15 mL de ácido acético glacial. A esta solução adicionou-se uma mistura de 2,5200 g de CAN e 4 mL de água destilada. A adição foi feita gota-a-gota.

A reação terminou ao fim de 1 hora e 30 minutos, como observado pela obtenção de uma única mancha de produto (mostrando a ausência do substrato inicial) com um R_f = 0,72 em CCF [eluyente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observada a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

Adicionaram-se 12 mL de água destilada para perfazer o volume para a extração. De seguida, foi feita a extração líquido-líquido com 3x75 mL de acetato de etilo, lavando-se depois a fase orgânica com 35 mL de uma solução saturada de NaHCO₃ e 35 mL de uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi

seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido foi um óleo de cor castanha-alaranjada, que foi posto a secar na estufa de vácuo.

Uma vez que os dados iniciais de ¹H RMN indicavam mistura de produtos, procedeu-se a uma purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 1:2 de acetato de etilo:éter de petróleo. O sólido obtido teve um aspeto amorfo, de cor acastanhada.

O rendimento final foi de 47%.

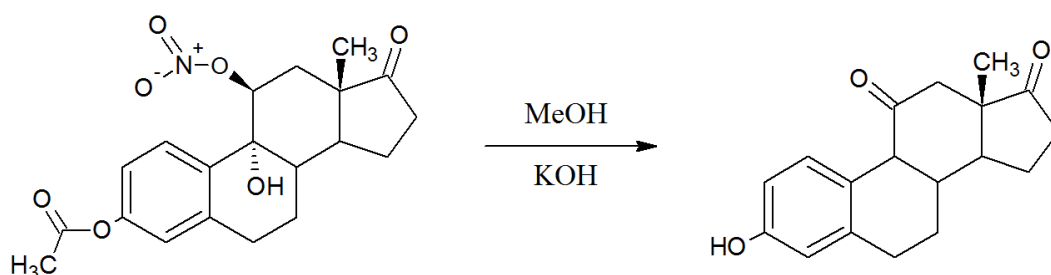
A análise por ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostrou os seguintes picos principais: δ 0,97 (3H, s, H18), 2,22 (3H, s, CH₃CO), 5,76 (1H, t, H11α), 6,85 (1H, brs, H4), 6,88 (1H, d, H2), 7,22 (1H, t, H1).

A análise por ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) mostrou os seguintes picos: δ 15,28, 20,06, 21,27, 21,31, 29,69, 31,29, 35,49, 38,21, 42,16, 46,40, 71,84, 81,43, 120,51, 123,15, 126,14, 134,94, 139,90, 150,64, 169,71 (CH₃CO), 218,00 (C¹⁷).

A análise por IV (cm⁻¹) mostrou os seguintes picos mais significativos: 1207, 1279, 1634, 1729, 1754, 2849, 2929, 2962, 3450.

3.1.3.4. Tentativas de hidrólise do acetato de 9α-hidroxi-11β-nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo ⁴⁴

3.1.3.4.1. Hidrólise utilizando metanol e KOH ⁴⁴



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,10 mmol (0,0374 g) de acetato de 9α-hidroxi-11β-

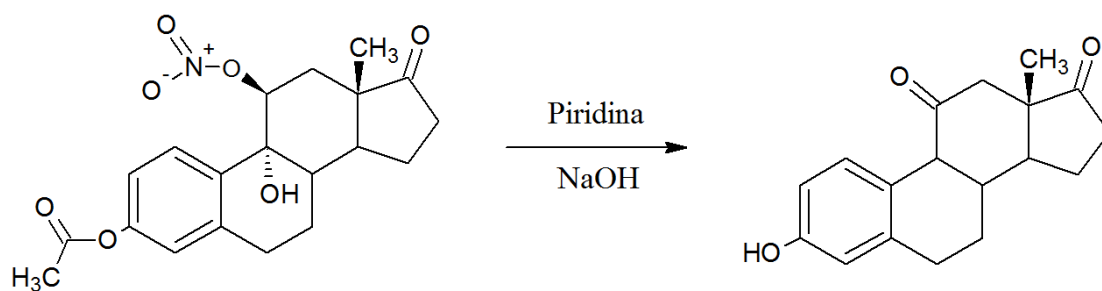
nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo em 0,627 mL de metanol. A esta solução adicionaram-se 0,0320 g de KOH.

Parou-se a reação ao fim de 18 horas e 30 minutos. Obtiveram-se três manchas: duas de produto, uma com valor de $R_f = 0,33$ e outra com valor de $R_f = 0,55$, e uma outra que se presume ser de substrato inicial, com um valor de $R_f = 0,70$, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], todas observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

O metanol foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. Depois adicionaram-se 5 mL de HCl 5%. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x20 mL de acetato de etilo, lavando-se no fim a fase orgânica com 10 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido foi sujeito a purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 1:2 de acetato de etilo:éter de petróleo. O sólido obtido teve um aspeto oleoso, de cor escura.

Mesmo após purificação em coluna cromatográfica, a análise por ^1H RMN (DMSO, 400 MHz) mostrou a existência de mistura de produtos, pelo que a reação não foi bem sucedida.

3.1.3.4.2. Hidrólise utilizando piridina e NaOH ³³



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,125 mmol (0,0467 g) de acetato de 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo em 0,89 mL de piridina. A esta solução adicionaram-se 0,09 mL de solução aquosa de NaOH a 20%.

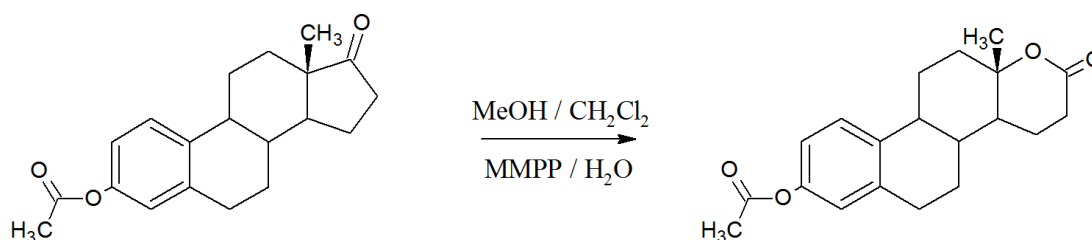
Parou-se a reação ao fim de 5 horas. Obtiveram-se duas manchas: uma com valor de $R_f = 0,65$, observável após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C , e outra com valor de $R_f = 0,49$, observável apenas a 254 nm sob luz UV, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1]

Diluiu-se a mistura reacional com 1 mL de água destilada (diluição 1:2). De seguida acidificou-se a mistura, em arrefecimento, com uma solução de HCl 10% até atingir um pH entre 4 e 5. Depois foi feita a extração líquido-líquido com 3x40 mL de acetato de etilo, lavando-se de seguida a fase orgânica com 10 mL de uma solução de HCl 10% e 10 mL de uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

Os resultados da análise ^1H RMN (DMSO, 400 MHz) mostraram-se inconclusivos, parecendo existir mistura de produtos, pelo que a reação não foi bem sucedida.

3.1.3.5. Síntese de de acetato de 17a-oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo

3.1.3.5.1. Reacção de Baeyer-Villiger utilizando MMPP ⁴⁵



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,27 mmol (0,0857 g) de acetato de estrona numa mistura de 23,7 mL de metanol, 11,9 mL de diclorometano, 0,72 mL de H₂O e 2,3207 g de MMPP.

A reação terminou ao fim de 18 horas e 30 minutos, obtendo-se três manchas: uma que se presume ser correspondente a resíduos do substrato inicial, com um valor de $R_f = 0,76$, e duas outras, uma com um valor de $R_f = 0,31$ e outra com um valor de $R_f = 0,19$, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo,

1:2], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

À mistura reacional adicionaram-se 30 mL de uma solução saturada de NaHCO₃. De seguida, foi feita a extração líquido-líquido com 3x50 mL de diclorometano, lavando-se depois a fase orgânica com 20 mL de uma solução saturada de NaHCO₃ e 40 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

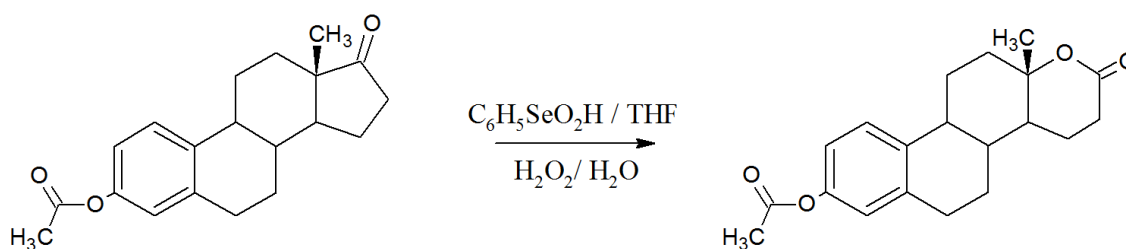
Uma vez que a CCF demonstrava a existência de mistura de compostos, procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 1:2 de acetato de etilo:éter de petróleo. O produto obtido foi um sólido de cor branca, que foi posto a secar na estufa de vácuo. Foi ainda feita, posteriormente, uma cristalização com metanol.

Apesar da existência de 3 manchas distintas em CCF, os dados obtidos em ¹H RMN demonstraram a existência de um único produto. O rendimento final obtido foi de 56%.

A análise por ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostrou os seguintes picos principais: δ 1,28 (3H, s, H18), 2,21 (3H, s, CH₃CO), 6,74 (1H, d, H4), 6,80 (1H, dd, H2), 7,21 (1H, d, H1).

A análise por ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz) mostrou os seguintes picos: δ 1,06, 19,77, 20,11, 21,17, 25,97, 27,32, 28,61, 29,58, 29,67, 39,20, 41,10, 42,86, 45,15, 77,23, 83,25, 119,06, 121,53, 126,46, 137,75, 171,62.

3.1.3.5.2. Reacção de Baeyer-Villiger com ácido benzenoselenínico e H₂O₂ ⁴⁶



Dissolveu-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 1 mmol (0,3124 g) de acetato de estrona numa mistura

de 18 mL de THF, 12 mL de H₂O, 13,6 mL de H₂O₂ 30% e 0,2456 g (1,3 mmol) de ácido benzenosselenínico.

Parou-se a reação ao fim de 28 horas, obtendo-se três manchas: uma que se presume ser resíduos de substrato inicial, com um valor de R_f = 0,85, e duas outras, uma com um valor de R_f = 0,55 e outra com um valor de R_f = 0,13, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

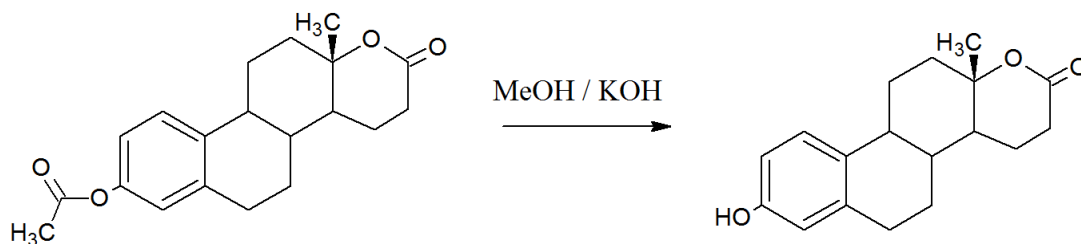
À mistura reacional adicionaram -se 100 mL de uma solução saturada de NaHCO₃. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 4x50 mL de acetato de etilo, lavando-se depois a fase orgânica com 50 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

O produto obtido foi um sólido de cor branca, que foi posto a secar na estufa de vácuo. Apesar da existência de 3 manchas distintas em CCF, os dados obtidos em ¹H RMN demonstraram a existência de um único produto. O rendimento final obtido foi de 54%.

A análise por ¹H RMN (DMSO, 400 MHz) e ¹³C RMN (DMSO, 100 MHz) mostrou dados similares aos descritos na secção 3.1.3.5.1.

3.1.3.6. Tentativas de hidrólise do acetato de 17a-oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo

3.1.3.6.1. Hidrólise utilizando KOH ⁴⁴



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,125 mmol (0,0410 g) de acetato de 17a-oxa-17-oxo-

homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo em 0,655 mL de metanol. A esta solução adicionaram-se 0,0325 g de KOH.

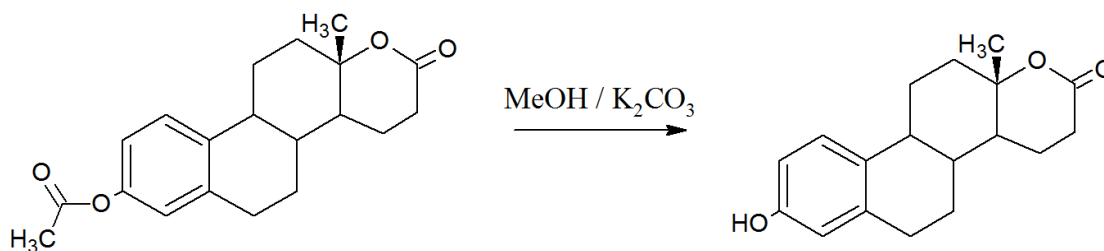
Parou-se a reação ao fim de 6 horas e 20 minutos, observando-se três manchas com valores de Rf distintos: Rf = 0,82, Rf = 0,73 e Rf = 0,24, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

Adicionaram-se algumas gotas de uma solução de HCl a 5% até neutralizar a base e, de seguida, fez-se o volume para a extração com 10 mL de água destilada. Depois foi feita a extração líquido-líquido com 3x30 mL de acetato de etilo, lavando-se a fase orgânica com 20 mL de uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

Uma vez que a CCF demonstrava a existência de uma mistura de produtos, procedeu-se a uma purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 1:2 de acetato de etilo:éter de petróleo.

Os resultados da análise ¹H RMN (DMSO, 400 MHz) mostraram-se inconclusivos, parecendo existir mistura de produtos, pelo que a reação não foi bem sucedida.

3.1.3.6.2. Hidrólise utilizando K₂CO₃³⁰



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,125 mmol (0,0410 g) de acetato de 17a-oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo em 1,2 mL de metanol. A esta solução adicionaram-se 0,0787 g de K₂CO₃.

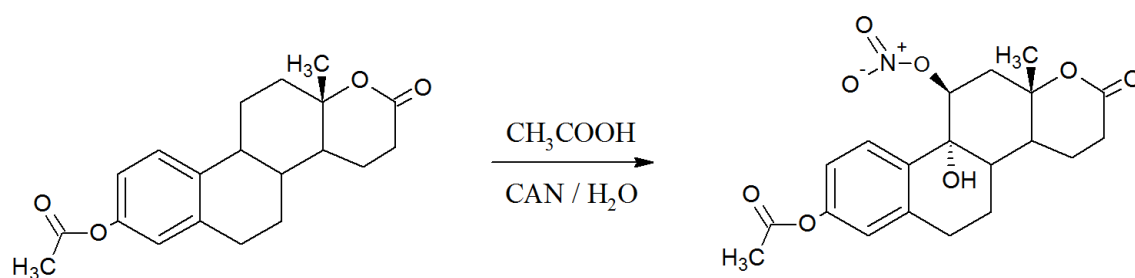
Parou-se a reação ao fim de 72 horas, observando-se quatro manchas com valores de Rf distintos: Rf = 0,77, Rf = 0,64, Rf = 0,52 e Rf = 0,09, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

Evaporou-se parcialmente o metanol e adicionaram-se 10 ml de uma solução de HCl a 5% para neutralizar a base e perfazer o volume para a extração. Depois foi feita a extração líquido-líquido com 3x30 mL de acetato de etilo, lavando-se a fase orgânica com 20 mL de uma solução saturada de NaCl. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

Uma vez que a CCF demonstrava a existência de uma mistura de produtos, procedeu-se a uma purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 1:2 de acetato de etilo:éter de petróleo.

Os resultados da análise ¹H RMN (DMSO, 400 MHz) mostraram-se inconclusivos, parecendo existir mistura de produtos, pelo que a reação não foi bem sucedida.

3.1.3.7. Síntese de acetato de 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo ³³



Dissolveu-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,25 mmol (0,0820 mg) de acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo em 3,75 mL de ácido acético glacial. A esta solução adicionou-se, de um outro balão, de 25 mL, uma mistura de 0,6300 g de CAN e 1 mL de água destilada. A adição foi feita gota-a-gota.

A reação terminou ao fim de 1 hora e 30 minutos, como observado pela ausência da mancha de substrato inicial. Obtiveram-se 6 manchas de produto, com Rf =

0,89, $R_f = 0,69$, $R_f = 0,58$, $R_f = 0,42$, $R_f = 0,31$ e $R_f = 0,17$ em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 6:1], observada a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

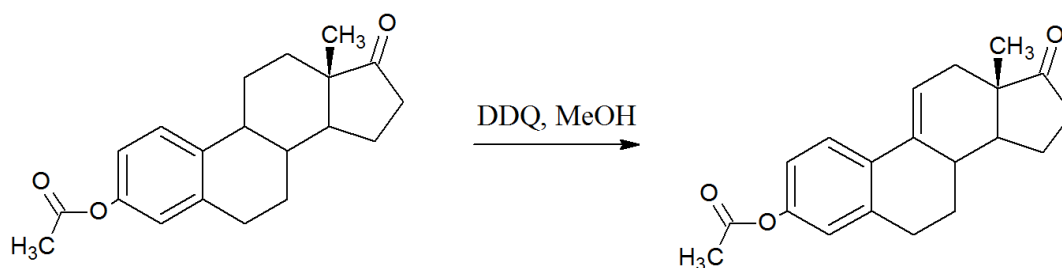
Foi feita a extração líquido-líquido com 3x40 mL de acetato de etilo, lavando-se depois a fase orgânica com 25 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 e 25 mL de uma solução saturada de NaCl . A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido foi um óleo de cor castanha-alaranjada, que foi posto a secar na estufa de vácuo.

Uma vez que a existência de múltiplas manchas em CCF indicava mistura de produtos, procedeu-se a uma purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 6:1 de acetato de etilo:éter de petróleo. Para a fração correspondente ao produto de interesse foi obtido um pó de cor laranja.

O rendimento final obtido foi de 16%.

A análise por ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) mostrou os seguintes picos mais significativos: δ 1,44 (3H, s, H18), 2,27 (3H, s, CH_3CO), 5,84 (1H, t, H11 α), 6,89 (1H, d, H4), 6,94 (1H, dd, H2), 7,32 (1H, d, H1).

3.1.3.8. Tentativa de síntese de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo⁴⁷



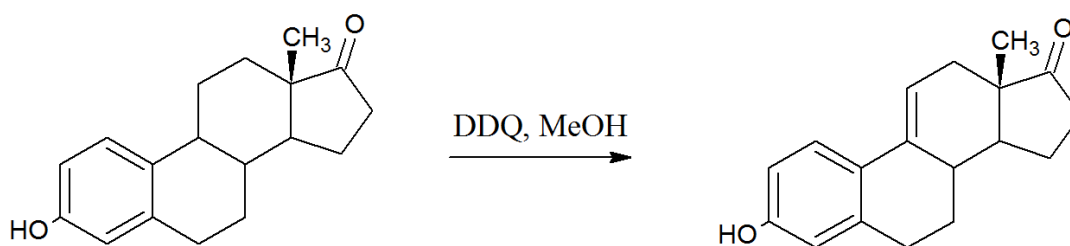
Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 3 tubuladuras de 100 mL, a 45 °C e sob agitação magnética, 0,5 mmol (0,1562 g) de acetato de estrona em 22,6 mL de metanol. A esta solução adicionou-se 0,1968 g de DDQ. A reação ocorreu em atmosfera fechada de azoto.

Parou-se a reação ao fim de 9 horas. Obtiveram-se duas manchas, uma correspondente ao produto, com valor de $R_f = 0,31$, e outra correspondente ao substrato inicial, com valor de $R_f = 0,51$, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 1:4], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

O metanol foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x50 mL de diclorometano, lavando-se a fase orgânica com 50 mL de sulfito de sódio 10%, 50 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 e 50 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto obtido foi sujeito a purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 1:4 de acetato de etilo:éter de petróleo. O produto final obtido consistiu de um pó claro de cor amarelada.

A análise por ^1H RMN (DMSO, 400 MHz) mostrou a possível existência de mistura de produtos, nomeadamente isómeros de posição, diferindo a localização da ligação dupla introduzida no anel C: entre C9 e C11 ou entre C8 e C9. Uma análise dos espectros obtidos será feita mais detalhadamente na secção de resultados e discussão.

3.1.3.9. Síntese de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona⁴⁷



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 3 tubuladuras de 100 mL, a 45 °C e sob agitação magnética, 0,5 mmol (0,1350 g) de estrona em 19,6 mL de metanol. A esta solução adicionou-se 0,1703 g de DDQ. A reação ocorreu em atmosfera fechada de azoto.

Parou-se a reação ao fim de 5 horas. Obtiveram-se duas manchas, com valores de $R_f = 0,79$, correspondente ao produto, e $R_f = 0,69$, correspondente a resíduos

substrato, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

O metanol foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x50 mL de acetato de etilo, lavando-se a fase orgânica com 25 mL de sulfito de sódio 10%, 25 mL de uma solução saturada de NaHCO₃ e 25 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido consistiu de um pó de cor alaranjada.

O rendimento final obtido foi de 95%.

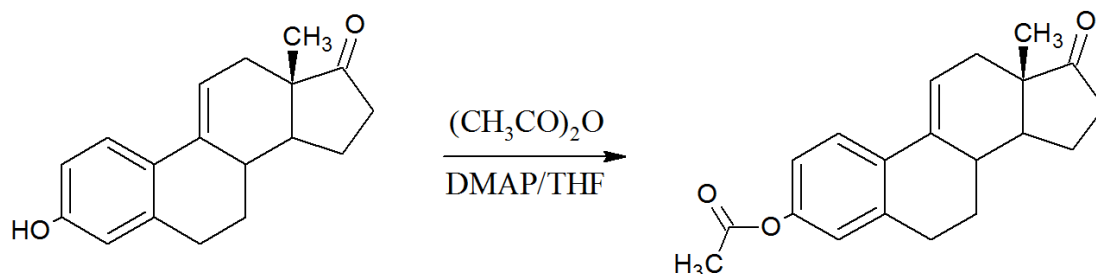
A análise por ¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz) mostrou os seguintes picos mais significativos: δ 0,87 (3H, s, H18), 6,06 (1H, m, H11), 6,50 (1H, s, H4), 6,59 (1H, dd, H2), 7,43 (1H, d, H1).

A análise por ¹³C RMN (DMSO, 100 MHz) mostrou os seguintes picos: δ 14,69, 22,52, 27,80, 29,68, 34,04, 36,20, 38,17, 45,93, 47,51, 114,31, 115,27, 115,70, 125,49, 125,59, 135,73, 137,67, 156,72, 220,91 (C¹⁷).

A análise por IV mostrou os seguintes picos mais relevantes: 1634, 1728, 2929, 2963, 3448.

3.1.3.10. Síntese de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo

43



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,4 mmol (0,1074 g) de 3-hidroxiestra-

1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona em 2,14 mL de THF. A esta solução adicionaram-se 0,0375 mL de anidrido acético e 0,0118 g de DMAP.

A reação terminou ao fim de 1 hora. Obtiveram-se duas manchas, com valores de $R_f = 0,74$, correspondente ao produto, e $R_f = 0,65$, correspondente a resíduos de substrato, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 1:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

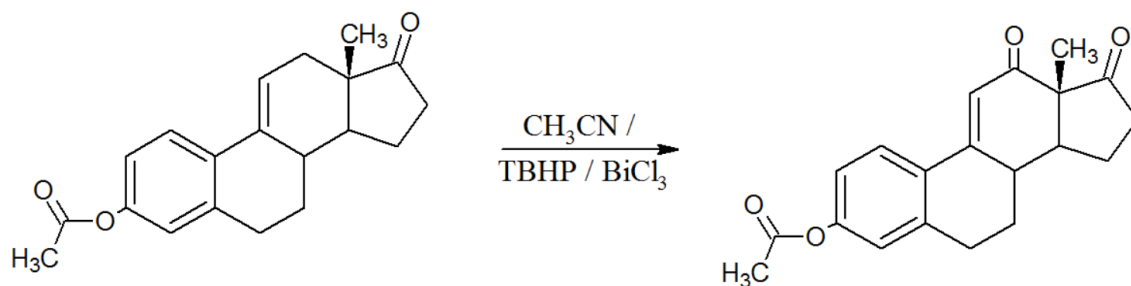
O THF foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 4x50 mL de acetato de etilo, lavando-se a fase orgânica com 25 mL de HCl 10%, 25 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 e 25 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo. O produto final obtido consistiu de um pó de cor arroxeadada

O rendimento final obtido foi de 89%.

A análise por ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) mostrou os seguintes picos mais relevantes: δ 0,86 (3H, s, H18), 2,22 (3H, s, CH_3CO), 6,17 (1H, m, H11), 6,76 (1H, d, H4), 6,79 (1H, dd, H2), 7,53 (1H, d, H1).

A análise por ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) mostrou os seguintes picos: δ 14,47, 21,14, 22,51, 27,56, 29,59, 34,02, 36,22, 37,99, 46,17, 47,79, 119,09, 119,38, 121,77, 125,25, 132,05, 135,17, 137,40, 149,41, 169,70 (CH_3CO), 221,53 (C^{17}).

3.1.3.11. Tentativa de oxidação alílica do acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo ⁴⁸



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 100 mL, à temperatura ambiente e sob agitação magnética, 0,3 mmol (0,0930 g) de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo em 1,2 mL de acetonitrilo. A esta solução adicionaram-se 0,3660 mL de *terc*-butil-hidroperóxido e, seguidamente, 0,0132 g de cloreto de bismuto (III).

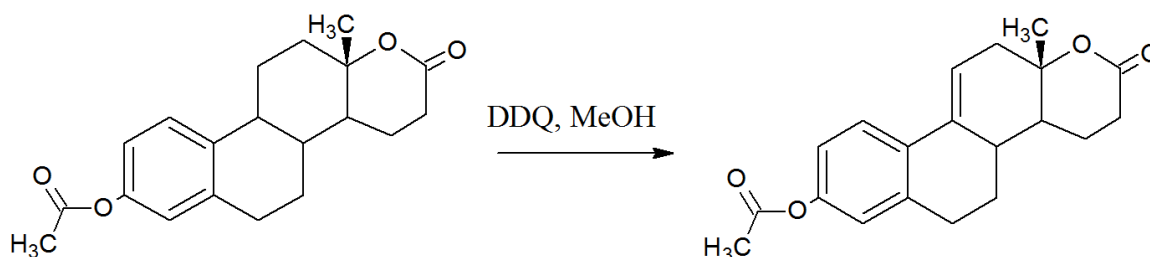
Parou-se a reação ao fim de 90 horas. Obtiveram-se três manchas, com valores de $R_f = 0,81$, $R_f = 0,67$ e $R_f = 0,44$, em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

A mistura reacional foi dissolvida em éter dietílico e adicionada a 100 mL de uma solução de sulfito de sódio a 10%, estando durante 2 horas sob agitação magnética. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x40 mL de éter dietílico, lavando-se a fase orgânica com 30 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 e 30 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

Uma vez que a CCF demonstrava a existência de uma mistura de produtos, procedeu-se a uma purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 2:1 de acetato de etilo:éter de petróleo.

Os resultados da análise ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) mostraram a existência de apenas substrato numa das frações e apresentaram-se inconclusivos para as restantes frações, pelo que a reação não foi bem sucedida.

3.1.3.12. Tentativa de síntese de acetato de 17a-oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo⁴⁷



Dissolveram-se, num balão de fundo redondo de 3 tubuladuras de 100 mL, a 45 °C e sob agitação magnética, 0,25 mmol (0,0822 g) de acetato de 17a-oxa-17-

oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo em 12 mL de metanol. A esta solução adicionou-se 0,2066 g de DDQ. A reação ocorreu em atmosfera fechada de azoto.

Parou-se a reação ao fim de 68 horas. Obtiveram-se três manchas, com valores de $R_f = 0,81$, $R_f = 0,63$ e $R_f = 0,37$ em CCF [eluente - acetato de etilo:éter de petróleo, 2:1], observadas a 254 nm sob luz UV e após revelação com uma mistura de etanol e ácido sulfúrico numa proporção de 9:1, seguida de aquecimento a 120°C.

O metanol foi evaporado parcialmente no evaporador rotativo. De seguida foi feita a extração líquido-líquido com 3x60 mL de acetato de etilo, lavando-se a fase orgânica com 25 mL de sulfito de sódio 10%, 25 mL de uma solução saturada de NaHCO_3 e 25 mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada a vácuo e o solvente foi evaporado no evaporador rotativo.

Uma vez que tanto a análise da CCF como do espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) sugeriam mistura de produtos, procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna, utilizando um eluente com uma proporção de 2:1 de acetato de etilo:éter de petróleo. No entanto, pareceu ter ocorrido degradação dos produtos na coluna, pelo que não foi possível a obtenção de um produto final puro.

3.2. Avaliação biológica

3.2.1. Materiais e equipamentos

Para a avaliação biológica foi utilizado também material variado: material corrente de laboratório, na sua maioria autoclavado; agitador de placas *GFL3005 Vidrolab*; balança analítica *KERN ABT* ($e = 1$ mg, $d = 0,01$ mg); banho de aquecimento *Polysat 36, Ficher Scientific*; câmara de fluxo laminar de segurança biológica classe II *LabGard*; câmara de *Neubauer Laboroptik*; centrífuga *Sigma 3K18C, Bioblock Scientific*; espectrofotómetro de microplacas *XMark Biorad*; incubadora com fluxo automático de CO_2 *Nuaire DHD*; medidor de pH *Orion Star A211, Thermo Scientific*; microscópio eletrónico *Olympus CK40*.

3.2.2. Reagentes e solventes

Foram utilizados, também nesta fase, variados compostos, adquiridos comercialmente a diferentes fabricantes: ácido clorídrico (l, *Fisher Chemical*), água *MilliQ* (l, purificada pelo sistema *Millipore Advantage*), azul de triptano (l, *Sigma-Aldrich*), bicarbonato de sódio (s, *Fisher Chemical*), dimetilsulfóxido (l, *Fisher Chemical*), hidróxido de sódio (s, *Sigma-Aldrich*), meio DMEM 5648 (s, *Sigma-Aldrich*), meio DMEM 7777 (s, *Sigma-Aldrich*), meio RPMI 1640 (s, *Sigma-Aldrich*), meio *Williams* (s, *Sigma-Aldrich*), MTT (s, *Acros organics*), soro fetal bovino (FBS) (l, *Sigma-Aldrich*), tampão fosfato salino concentrado (PBS) (l, *Sigma-Aldrich*), tripsina (s, *Sigma-Aldrich*).

3.2.3. Protocolo experimental para avaliação da proliferação celular

Para qualquer um dos ensaios de proliferação celular, foi seguido um procedimento experimental geral, que se encontra representado na figura 17, sendo seguidamente explicadas detalhadamente cada uma das etapas do mesmo.

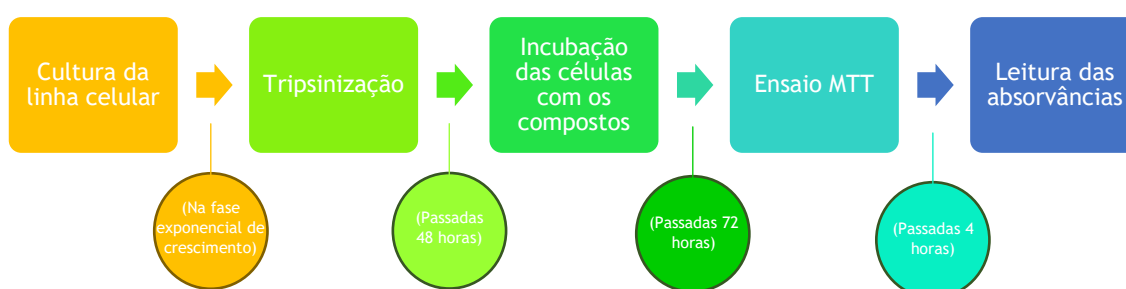


Figura 17 - Procedimento experimental geral dos ensaios de proliferação celular efetuados.

3.2.3.1. Cultura celular

Neste estudo foram utilizadas 6 linhas celulares: *Caco-2*, células epiteliais humanas do adenocarcinoma colorretal; *HepaRG*, células hepáticas humanas; *LNCaP*, células humanas do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios; *MCF-7*, células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios; *NHDF*, fibroblastos da derme humana não cancerígenos; e *T47D*, uma outra linha de células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios.

Todas as linhas foram mantidas em incubadora sob condições controladas de temperatura e composição de atmosfera (37° C, 5% CO₂). Cada um dos meios

utilizados (DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*; *Williams*) foi preparado utilizando água *MilliQ* e NaHCO_3 (tampão), com ajuste de pH, e filtrados e suplementado com 10% de FBS e 1% de mistura de antibióticos (SP - estreptomicina e penicilina - ou AB - estreptomicina, penicilina e anfotericina B) (tabela 2).

Tabela 2 - Resumo das condições a que foram submetidas as várias linhas celulares aquando da cultura para crescimento.

Linha Celular	Meio	pH	Antibiótico	Constituintes adicionais
Caco-2	DMEM 5648	7,2	SP	-
HepaRG	Williams	7,4	SP	Insulina e hidrocortisona
LNCaP	RPMI	7,2	SP	-
MCF-7	DMEM 7777	7,4	AB	-
NHDF	DMEM 7777	7,4	AB	-
T47D	RPMI	7,2	SP	-

3.2.3.2. Tripsinização e sementeira

A tripsinização consiste na utilização de uma enzima proteolítica, a tripsina, para desagregar as células tanto do fundo do recipiente onde se encontram aderidas, como umas das outras, por forma a ficarem em suspensão.

Quando as culturas celulares atingiram a fase exponencial de crescimento, procedeu-se então à sua tripsinização: primeiramente, aspirou-se o meio existente na caixa de células e adicionou-se PBS, por forma a eliminar o meio com soro (uma vez que, caso não se efetuasse este passo, o soro do meio iria neutralizar a tripsina); após aspiração do PBS, adicionou-se a solução de enzima e colocou-se a caixa a incubar durante 5 minutos (37°C , 5% CO_2); passado esse período de tempo, observaram-se as células ao microscópio para verificar se se encontravam realmente em suspensão; adicionou-se depois meio completo (para neutralizar a tripsina) e, após um processo de homogeneização, colocou-se todo o conteúdo da caixa num tubo de *falcon*, que foi a centrifugar durante 8 minutos, a 1000 rpm; seguidamente, a maior parte do sobrenadante foi aspirado e o *pellet* foi ressuscitado após a adição de novo meio completo; do mesmo *falcon* foram retirados 10 μL para um tubo de *ependorf*, ao qual foram

adicionados 10 μL da solução do corante azul de triptano; os 20 μL resultantes foram colocados numa câmara de *Neubauer* para contagem celular.

A câmara de *Neubauer* foi observada ao microscópio e, pelo cálculo da média de células existentes em cada quadrante, foi possível calcular o volume de solução celular necessário de colocar em cada poço de caixa *multiwells*, tendo como ponto de partida a densidade celular inicial pretendida (2×10^4). Após o enchimento de cada poço com a quantidade necessária de solução celular (ou água, quando aplicável), a caixa foi então colocada na incubadora durante 48 horas (37°C , 5% CO_2).

3.2.3.3. Incubação das células com os compostos

Para os estudos de *screening* da atividade anti-proliferativa (passadas 48 horas da sementeira celular): preparou-se uma solução-mãe de cada composto em DMSO, a 10 mM, e preparou-se, para cada um, uma solução com meio a uma concentração de 30 μM ; procedeu-se de seguida à homogeneização das soluções preparadas e, após a aspiração do meio existente nos poços da caixa *multiwells* previamente semeada, as células foram postas em contacto com a solução de compostos + meio (ou só meio, no caso dos poços de controlo). A caixa foi então colocada na incubadora durante 72 horas (37°C , 5% CO_2).

Na figura 18 (lado esquerdo) apresento a representação geral de uma caixa *multiwells* em estudos de *screening* (soluções de compostos a uma única concentração - 30 μM), onde A corresponde à moldura de água que deve rodear os poços de células (hidratação), C corresponde aos poços de controlo (não vão ser incubados com compostos) e a numeração aos poços em que foram inseridos os compostos.

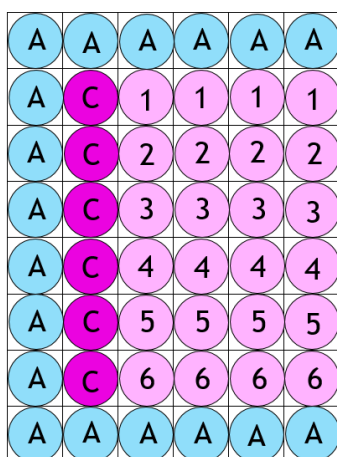


Figura 18 - Representação esquemática de metade de uma caixa *multiwells* para o ensaio da proliferação celular a 30 μ M. A - água; C - controlo (meio + células); restantes poços - meio + células + compostos, nos quais cada número corresponde a um composto diferente.

3.2.3.4. Ensaio MTT

Após 72 horas de incubação das células com os compostos, procedeu-se ao ensaio de avaliação da proliferação celular propriamente dito, o ensaio MTT: primeiramente, preparou-se a solução de MTT em PBS à concentração pretendida (5 mg/mL); depois, filtrou-se essa mistura para um tubo de *falcon* contendo meio, colocando-se de seguida num cristizador e tapando-se a solução com papel de alumínio; após a aspiração dos poços da caixa *multiwells* previamente incubada (cuidadosamente, por forma a não aspirar as células) colocou-se PBS nos mesmos poços e aspirou-se novamente; de seguida, colocou-se em cada poço a solução de MTT com meio; envolveu-se depois a caixa *multiwells* em papel de alumínio e colocou-se a incubar (37°C, 5% CO₂) durante 4 horas. Passado esse período de tempo, o meio contido em cada poço foi aspirado (cuidadosamente, para não aspirar os cristais formados) e foi adicionado a cada um deles DMSO, por forma a dissolver os cristais. A placa *multiwells* foi então colocada sob agitação e, após dissolução completa visível dos cristais, foi lida a absorvância dos poços a 570 nm.

Nesta última fase da avaliação da atividade biológica celular é importante realçar que todo o processo tem que ser realizado na ausência de luz, uma vez que o reagente MTT é fotossensível. A cobertura do material onde se encontra o reagente, ao longo dos vários passos, com papel de alumínio serve exatamente para o proteger da luz.

Mais especificamente, e como resumo, a síntese orgânica consistiu em:

1. Proteção do grupo hidroxilo na posição 3 da molécula de estrona por acetilação;
2. Sujeição do derivado acetilado referido no ponto anterior (ponto 1) a condições de hidrólise;
3. Síntese de um derivado da molécula de estrona acetilada (ponto 1) funcionalizado no anel C por adição de um grupo hidroxilo na posição 9 α e de um grupo nitro-oxi na posição 11 β ;
4. Sujeição do derivado 9 α -hidroxilado e 11 β -nitro-oxidado referido no ponto anterior (ponto 3) a condições de hidrólise;
5. Alargamento do anel D do derivado acetilado da molécula de estrona (ponto 1) por obtenção de uma lactona nesse mesmo anel;
6. Sujeição do derivado lactona referido no ponto anterior (ponto 5) a condições de hidrólise;
7. Síntese de um derivado da molécula de estrona acetilada e funcionalizada no anel D (lactona, ponto 5), funcionalizando o anel C por adição de um grupo hidroxilo na posição 9 α e de um grupo nitro-oxi na posição 11 β ;
8. Tentativa de introdução de uma dupla-ligação entre as posições 9 e 11 da molécula de estrona acetilada (ponto 1);
9. Introdução de uma dupla-ligação entre as posições 9 e 11 da molécula de estrona e posterior acetilação;
10. Tentativa de oxidação alílica da molécula de estrona $\Delta^{9,11}$ acetilada (ponto 8), para introdução de uma cetona na posição 12;
11. Tentativa de introdução de uma dupla-ligação entre as posições 9 e 11 da molécula de estrona acetilada e funcionalizada no anel D (lactona, ponto 5).

4.1.2. Interpretação de resultados

Os resultados obtidos variaram entre reações. Algumas ocorreram de acordo com o esperado, outras não. Analisemos cada caso separadamente.

A reação de acetilação da molécula de estrona ocorreu de acordo com o esperado, dando origem a um único produto, como demonstrado pela obtenção de uma única mancha na análise em CCF, e posteriormente confirmado pela análise dos espectros IV e ^1H e ^{13}C RMN. Os sinais obtidos são concordantes com o descrito na literatura. Não foi, assim, necessária purificação adicional pós *work-up*. Foi uma reação relativamente rápida (4 horas) e obteve-se um rendimento elevado (94%).

As reações de desacetilação da molécula de acetato de estrona por sujeição a condições alcalinas de hidrólise ocorreram também de acordo com o previsto, dando ambas origem a um único produto, como demonstrado pela obtenção de uma única mancha na análise em CCF, e posteriormente confirmado pela análise dos espectros IV e ^1H e ^{13}C RMN. Os sinais obtidos são concordantes com o descrito na literatura.³⁰ Não foi, assim, também necessária purificação adicional pós *work-up* em nenhuma delas. Contudo, existiram algumas diferenças entre as duas. Enquanto que numa das reações foi utilizado KOH, na outra foi utilizado K_2CO_3 , uma base mais fraca. Utilizaram-se, desta forma, condições reacionais mais agressivas primeira reação, o que resultou numa transformação mais rápida de substrato em produto, que demorou apenas 30 minutos, enquanto que a segunda reação necessitou de 1 hora e 30 minutos para ocorrer a transformação completa de substrato em produto. No entanto, o rendimento obtido na reação com K_2CO_3 foi mais elevado, sendo de 97%, enquanto que o rendimento da reação com KOH foi de 89%. Assim, embora tenha demorado mais tempo a ocorrer completamente, a hidrólise utilizando condições reacionais mais suaves deu origem a um maior rendimento. O objectivo deste estudo comparativo de hidrólise era verificar se esta ocorria igualmente e com bom rendimento usando K_2CO_3 , para posteriormente a tentar aplicar, nomeadamente, ao acetato de estrolactona para analisar se ocorria hidrólise do éster linear e/ou do éster cíclico.

A reação de nitro-oxidação do acetato de estrona ocorreu conforme o previsto. Embora se tenha obtido uma única mancha na análise em CCF, uma análise posterior do espectro ^1H RMN indicou a existência de mistura de produtos. Procedeu-se então a uma purificação por cromatografia em coluna, sendo que o produto obtido já deu origem a sinais concordantes com o descrito na literatura para RMN de protões e carbono 13. Foi uma reação relativamente rápida (1,5 horas), no entanto necessitou de purificação adicional e o rendimento obtido foi moderado (47%).

As reações de hidrólise do acetato de estrona 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi por sujeição a condições alcalinas não ocorreram consoante o pretendido. Mesmo usando condições reacionais diferentes, metanol e KOH numa, e piridina e NaOH noutra, os resultados obtidos foram semelhantes para ambas as reações: múltiplas manchas em CCF e resultados que sugerem mistura de produtos na análise dos espectros de RMN de protões. A obtenção de múltiplas manchas poderá ter ocorrido devido à obtenção de múltiplos produtos pela clivagem do grupo acetato em C3, e modificações químicas nos grupos hidroxilo em C9 e

nitrooxi em C11 e/ou uma combinação destas transformações. Mesmo com a realização de cromatografia em coluna para tentativa de separação de compostos, não foi possível separar os diversos produtos possíveis, pelo que não se conseguiu isolar um produto único final.

As reações de formação de uma lactona no anel D da molécula de acetato de estrona ocorreram segundo o previsto. No caso da reação na qual foi utilizado MMPP como oxidante, embora após o *work-up* inicial a CCF mostrasse a existência de uma mistura de produtos, foi possível isolar o produto pretendido através de separação por coluna cromatográfica. Adicionalmente, a cristalização com metanol permitiu a obtenção de cristais, originando um composto de maior pureza. Na reação em que se utilizou ácido benzenosselenínico e água oxigenada, não foi necessária purificação adicional pós *work-up*. Em ambas as reações, os sinais do espectro ^1H RMN são concordantes com o descrito na literatura, e os dados do espectro RMN de carbono estão também de acordo com o teoricamente previsto. No entanto, apesar da obtenção do produto pretendido, não se pode dizer que nenhuma das reações tenha sido rápida. E embora a reação com MMPP tenha sido em si mais rápida (18,5 horas) que a com ácido benzenosselenínico+ H_2O_2 (28 horas), esta última não necessitou de dispêndio de tempo e de cromatografia adicional para purificação. Uma outra diferença foi que, uma vez que se utilizou uma quantidade elevada de água na própria mistura reacional, o composto obtido a partir da reação com ácido benzenosselenínico demorou bastante tempo a secar completamente. O rendimento foi semelhante e não muito elevado com ambas as condições reacionais (56% e 54%). Sendo assim, tendo os recursos disponíveis para purificação por coluna, optaria pela reação com MMPP para produção da lactona no anel D, uma vez que o tempo total despendido é menor e não há no composto final uma quantidade de água residual que demore a ser removida e possa, inclusive, comprometer a integridade do produto.

As reações de hidrólise da molécula de acetato de estrolactona por sujeição a condições alcalinas diferentes de hidrólise não ocorreram conforme o pretendido, que seria a hidrólise seletiva do éster linear. Embora se tenham usado bases diferentes, KOH numa reação e K_2CO_3 noutra, os resultados obtidos foram semelhantes para ambas as reações: múltiplas manchas pré *work-up* em CCF e resultados inconclusivos na análise dos espectros de RMN de prótons. Uma possível explicação para a obtenção de múltiplas manchas terá sido a obtenção de múltiplos produtos pela clivagem do grupo acetato em C3, da lactona no anel

D, ou de ambos em simultâneo. No entanto, não foi possível o seu isolamento através da cromatografia em coluna

Na reação de nitro-oxidação do acetato de estrolactona, após o *work-up* inicial, uma vez que a análise em CCF indicou a presença de uma mistura de produtos, procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna. A fração que se conseguiu isolar e correspondente ao produto de interesse deu origem a sinais concordantes com o descrito na literatura para moléculas similares em ^1H RMN. Esta foi uma reação relativamente rápida (1,5 horas), tal como a anterior, com acetato de estrona, no entanto, houve necessidade de recorrer a purificação adicional e o rendimento obtido foi baixo (16%). Consequentemente, não foi possível obter uma quantidade de produto suficiente para análises de espectroscopia adicionais (^{13}C RMN e IV), nem para avaliação biológica. Pretendemos futuramente repetir e otimizar esta reação.

Na reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona procedeu-se a uma purificação por cromatografia em coluna após o *work-up* inicial. No entanto, mesmo após coluna, no espectro RMN de protão da fração de interesse existiam ainda sinais que sugeriam mistura de produtos. Uma análise mais detalhada do mesmo levou a concluir que poderá ter ocorrido formação de isómeros de posição (figura 20): um isómero com uma ligação dupla introduzida entre os carbonos 9 e 11 ($\Delta^{9,11}$) e outro isómero com uma ligação dupla introduzida entre os carbonos 8 e 9 ($\Delta^{8,9}$), o que explicaria que não se visualizassem manchas diferentes na CCF, uma vez que ambos os compostos têm massa molecular e polaridade muito idênticas. Por esta mesma razão, não foi possível separá-los e isolar o produto desejado.

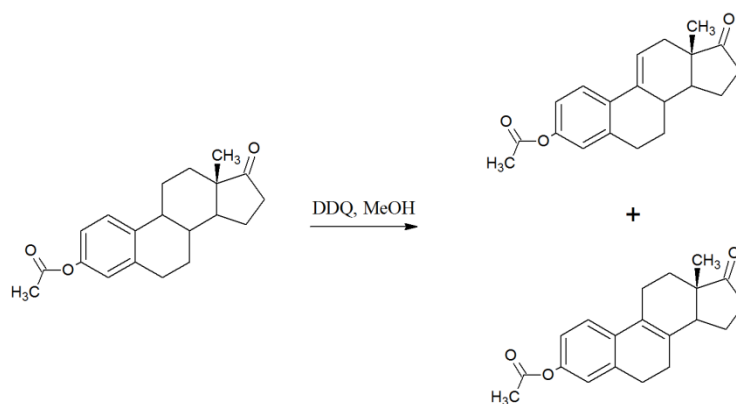


Figura 20 - Esquema reacional da possível isomerização ocorrida.

Numa análise mais detalhada do espectro ^1H RMN (figuras 21 e 22), pela integração dos sinais verifica-se que cerca de 53% da mistura de produtos poderá corresponder ao isómero $\Delta^{9,11}$ e cerca de 47% ao isómero $\Delta^{8,9}$. A existência de um único sinal a aproximadamente 6,05 ppm, atribuído ao H11 do isómero $\Delta^{9,11}$, conjuntamente com a não existência de um sinal semelhante nas suas proximidades, é o dado que mais sugere isomerização posicional da dupla ligação, uma vez que o isómero $\Delta^{8,9}$ não tem hidrogénios vinílicos. No entanto, para a obtenção de uma maior confiança nas afirmações feitas seria necessária a realização de estudos mais pormenorizados.

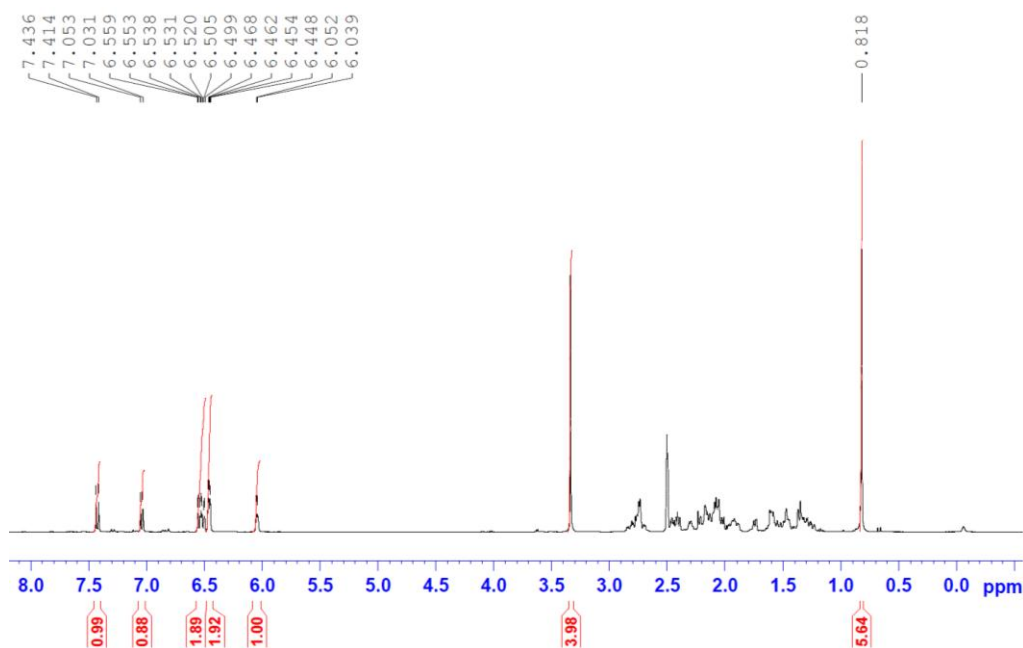


Figura 21 - Espectro ^1H RMN completo da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona.

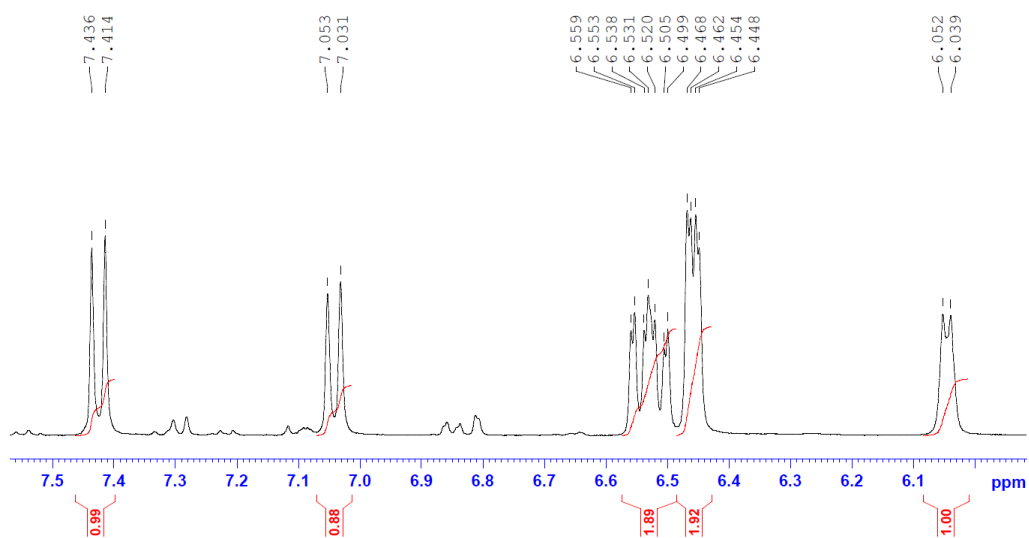


Figura 22 - Ampliação do espectro ^1H RMN da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona.

Posto isto, optou-se por uma via reacional diferente, introduzindo-se uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de estrona primeiramente, e acetilando posteriormente a molécula originada, por forma a obter o produto pretendido sem a ocorrência de isomerização posicional (as quais se encontram descritas nos 2 parágrafos seguintes).

A reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 na molécula de estrona ocorreu de acordo com o previsto, dando origem a um único produto, como demonstrado pela obtenção de uma única mancha na análise de CCF, e posteriormente confirmado pela análise do espectro ^1H RMN. Os sinais obtidos são concordantes com o descrito na literatura. Não foi, assim, necessária purificação adicional pós *work-up*. Foi uma reação relativamente rápida (5 horas) e obteve-se um rendimento muito elevado (95%).

Na reação de acetilação da molécula de estrona $\Delta^{9,11}$ foi já possível a obtenção de um único produto. A molécula de estrona $\Delta^{9,11}$ foi assim acetilada, obtendo-se duas manchas em CCF (uma delas muito ténue, atribuída a resíduos de substrato). No entanto, na análise dos espectros ^1H e ^{13}C de RMN, os resultados apenas demonstraram a existência de um único produto. Foi uma reação relativamente rápida (4 horas) e obteve-se um rendimento elevado (89%).

A reação de introdução de uma cetona no carbono 12 da molécula de acetato de estrona $\Delta^{9,11}$ não ocorreu conforme o esperado. A reação parou-se após vários dias, uma vez que a CCF mostrava não estar evoluir a partir de certo ponto no tempo, e observavam-se três manchas: duas correspondentes a possíveis produtos, e uma correspondente ao substrato, esta última de grande intensidade. Como não havia evidência de estar a ocorrer qualquer progressão, procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna. Os resultados de ^1H RMN demonstraram a existência de apenas substrato numa das frações e apresentaram-se inconclusivos para as restantes frações, talvez por estarem muito diluídas devido à muito fraca transformação de substrato em produtos. Uma possível razão para estes resultados poderá ser o facto de a posição onde se pretendia introduzir o grupo químico em causa (C12) estar bastante impedida em termos estereoquímicos, uma vez que o grupo metilo em C18 poderá funcionar como uma espécie de “escudo”.

A reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona com lactona no anel D não ocorreu segundo o previsto. Uma vez que tanto a análise de CCF (três manchas, possivelmente correspondentes a três moléculas distintas) como do espectro inicial ^1H RMN a 400 Hz sugeriam mistura de produtos, procedeu-se à purificação por cromatografia em coluna. No entanto, numa análise dos espectros RMN de próton das frações resultantes, parece ter ocorrido degradação do produto na coluna. Nas figuras 24 e 25 pode verificar-se a presença de sinais que sugerem a existência do produto pretendido antes da tentativa de purificação: δ 1,28 (3H, s, H18), 1,94 (3H, s, CH_3CO), 4,83 (1H, m, H11), 6,46 (1H, d, H4), 6,50 (1H, dd, H2), 7,09 (1H, d, H1).

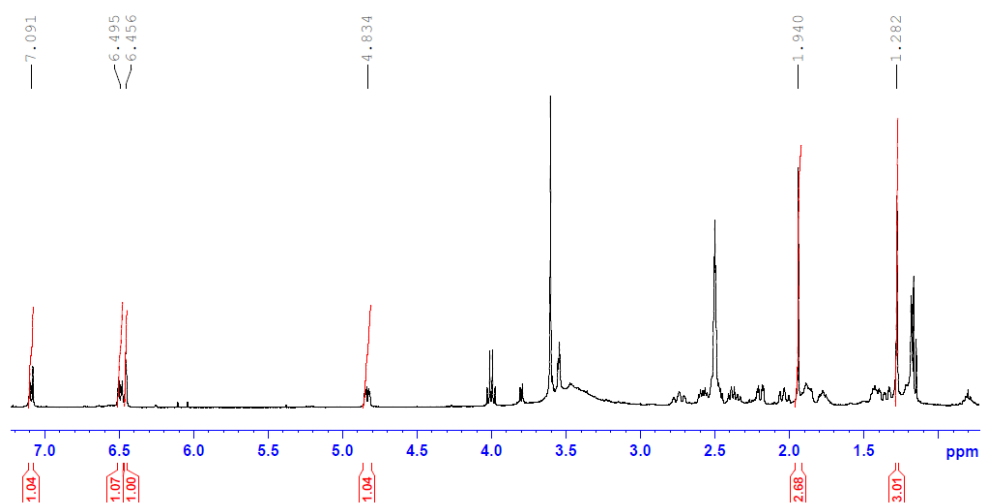


Figura 23 - Espectro ^1H RMN completo da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona com lactona no anel D

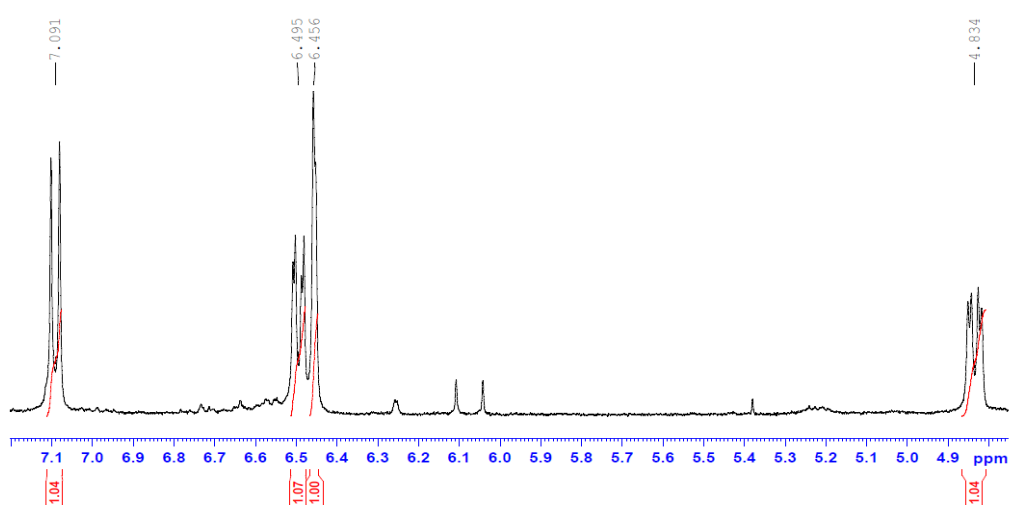


Figura 24 - Pormenor do espectro ^1H RMN da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 da molécula de acetato de estrona com lactona no anel D

4.2. Avaliação biológica

Foi testado o potencial inibitório da proliferação celular de alguns dos compostos sintetizados, recorrendo-se ao ensaio MTT. Neste ensaio, o MTT foi convertido pelas células viáveis a formazano, um precipitado insolúvel de cor roxa. Após a solubilização desse precipitado, foi determinada a absorvância a 570 nm por espectrofotometria UV-visível de cada poço das placas onde se encontravam as células, com um maior valor de absorvância a corresponder a uma maior proliferação celular.⁴⁹

Um dos objetivos foi, para todas as moléculas, comparar os resultados obtidos nas várias linhas celulares tumorais com os obtidos em células não-cancerígenas (células normais da pele), por forma a determinar a seletividade da atividade anti-proliferativa. Outro objetivo seria testar várias concentrações diferentes para os compostos que inibissem a proliferação celular em mais de 50% a $30\mu\text{M}$, resultados traduzidos em curvas concentração-resposta. Porém, devido a impedimento de tempo, só o primeiro objetivo foi conseguido para alguns compostos, pretendendo-se futuramente efetuar os estudos de dose-resposta.

Os resultados dos ensaios preliminares de proliferação celular (com os efeitos de todos os compostos analisados à concentração de $30\mu\text{M}$) estão representados nas figuras 25 e 26, sendo que não foi possível testar todos os compostos em todas as linhas celulares. Para efeitos de análise de dados, o controlo correspondeu a 100% e os dados de efeitos na proliferação celular dos compostos são apresentados em comparação com este controlo.

Pela análise do gráfico da figura 25 é possível retirar algumas conclusões acerca da aparente atividade anti-proliferativa dos compostos testados:

- O acetato de 9α -hidroxi- 11β -nitrooxi- 17α -oxoestra- $1,3,5(10)$ -trien- 3 -ilo é o composto com atividade anti-proliferativa mais marcada, de forma generalizada, atingindo resultados inibitórios bastante superiores aos dos restantes compostos em todas as linhas celulares estudadas. Conhecendo-se o seu possível mecanismo de ação (libertação de óxido nítrico), não é um resultado surpreendente. Faltam, no entanto, dados comparativos em relação ao seu efeito em células

normais da pele, uma vez que, caso não haja uma mínima seletividade, poderá perder o interesse terapêutico, pois será tóxico não só para tecidos tumorais como também para tecidos saudáveis;

- A seguir ao composto nitro-oxidado, a $\Delta^{9,11}$ -estrona é aquela que mais inibe a proliferação das células hepáticas, seguida da estrona, e do acetato de $\Delta^{9,11}$ -estrona, o que poderá indicar alguma seletividade de ação derivada daquela estrutura molecular;

- O crescimento das células da mama é inibido principalmente pelo composto nitro-oxidado, depois pelo acetato de $\Delta^{9,11}$ -estrona, seguido da $\Delta^{9,11}$ -estrona, do acetato de estrolactona e, por fim, do próprio acetato de estrona. Isto poderá sugerir que a modificação no anel C, principalmente por introdução de grupos polares, pode ter interesse no desenvolvimento deste tipo de compostos com ação anti-proliferativa.

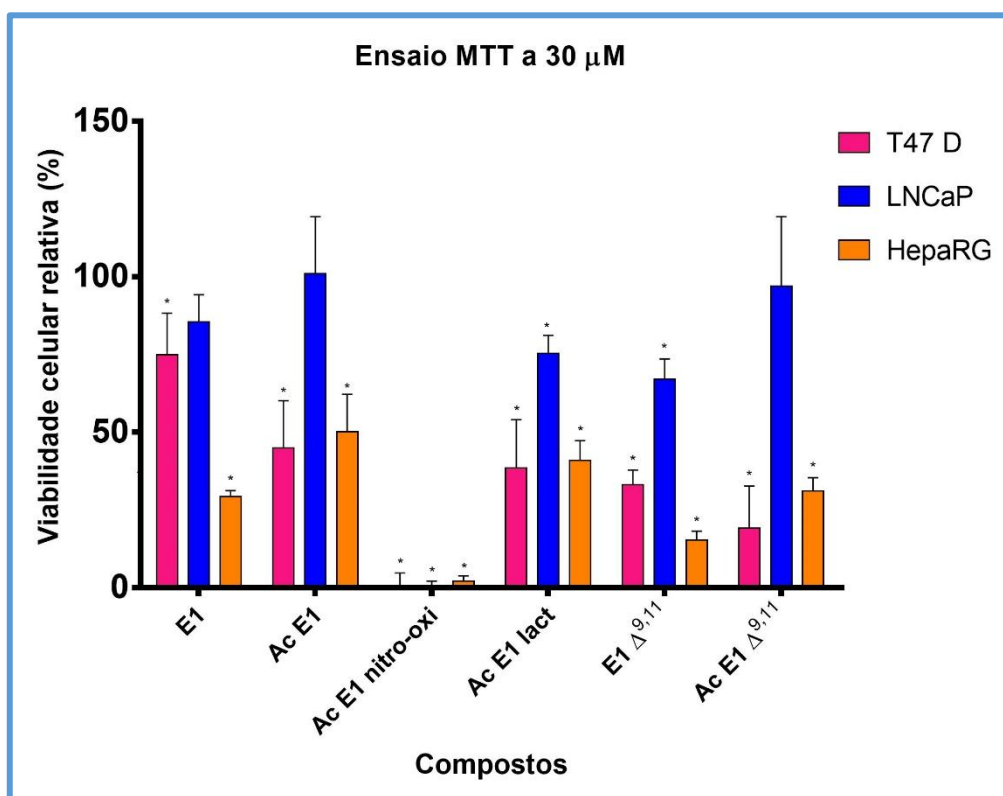


Figura 25 - Gráfico de percentagem de proliferação celular relativa obtida a 30 μM para cada um dos compostos testados, nas linhas celulares onde foram testados todos. E1 - estrona; Ac E1 - acetato de estrona; Ac E1 nitro-oxi - 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi estrona acetato; Ac E1 lact - acetato de estrolactona; E1 $\Delta^{9,11}$ - $\Delta^{9,11}$ -estrona; Ac E1 $\Delta^{9,11}$ -

acetato de $\Delta^{9,11}$ -estrona; * - resultados para os quais $p < 0,05$ (teste *t* de *Student*) em relação ao respetivo controlo negativo.

Pela análise do gráfico da figura 26 é possível também concluir acerca do efeito da introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 na atividade anti-proliferativa da molécula de estrona:

- A atividade anti-proliferativa parece aumentar em todas as linhas celulares cancerígenas, exceto nas células do intestino (Caco-2). No entanto, é também maior a atividade anti-proliferativa da estrona $\Delta^{9,11}$ nas células normais da pele (NHDF), comparativamente com a molécula de estrona, o que poderá sugerir algum tipo de toxicidade;

- A diminuição de viabilidade celular mais significativa ocorre nas células T47D. No entanto, sendo também uma linha de células da mama estrogénio-dependentes, não se verifica o mesmo na linha MCF-7, na qual já não há tanta diferença entre a ação inibitória dos dois compostos (embora os valores de viabilidade já fossem mais baixos que nas T47D para a estrona).

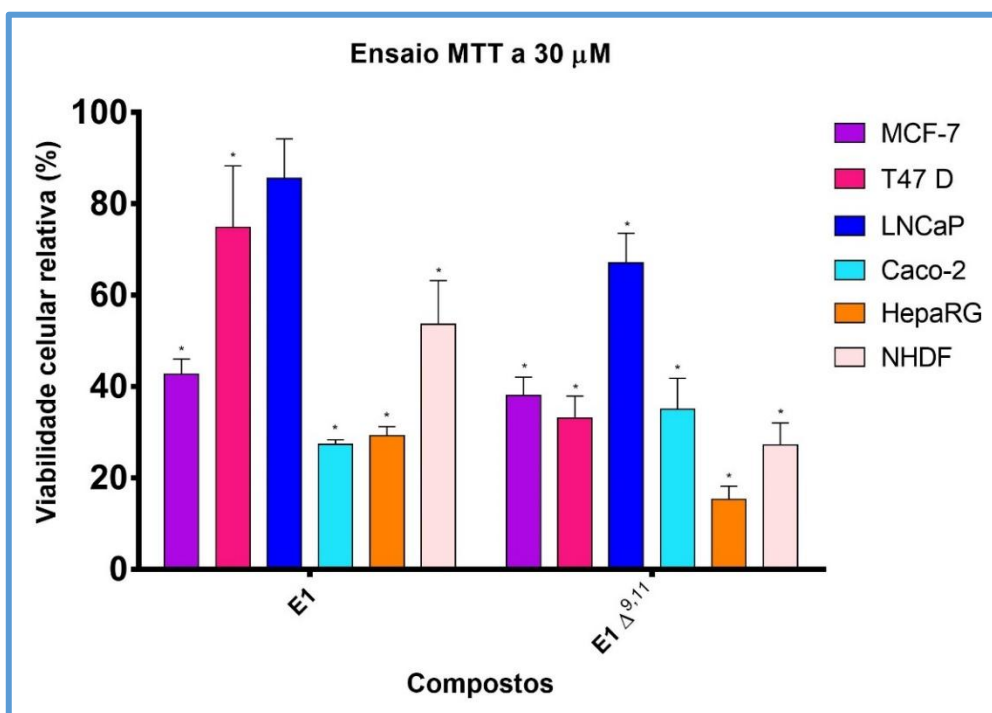


Figura 26 - Gráfico de percentagem de viabilidade celular relativa obtida a 30 μM para os compostos que foram testados em todas as linhas celulares. E1 - estrona; E1 $\Delta^{9,11}$ - $\Delta^{9,11}$ -estrona; * - resultados para os quais $p < 0,05$ (teste *t* de *Student*) em relação ao respetivo controlo negativo.

5. Conclusões

A síntese de derivados da molécula de estrona funcionalizados nos anéis C e D revelou-se, em alguns casos, desafiante.

As reações de acetilação da estrona, hidrólise do acetato de estrona e formação de uma lactona no anel D da mesma molécula acetilada mostraram ser menos problemáticas, no entanto, quer a nitro-oxidação do acetato de estrona, quer a nitro-oxidação da mesma molécula com lactona do anel D demonstraram resultar em compostos de mais difícil purificação, dando origem, conseqüentemente, a rendimentos baixos. A introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 do acetato de estrona mostrou ser complexa inicialmente, no entanto, foi conseguida através de uma via alternativa de síntese (introdução da dupla ligação na molécula de estrona e posterior acetilação do composto resultante).

Os estudos de hidrólise do acetato de 9 α -nitrooxi-11 β -hidroxi-estrona e do acetato de estrolactona mostraram ser as reações mais difíceis, provavelmente pela existência nas próprias moléculas de vários locais suscetíveis de hidrolisar, dando origem a misturas de produtos que não foi possível separar em coluna cromatográfica.

Em relação aos resultados de avaliação biológica, a nitro-oxidação da molécula em C11 deu origem a um derivado de elevada ação anti-proliferativa. Para além disso, tanto a formação de uma lactona no anel D, como a introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11, funcionalidades que estão associadas a uma redução da estrogénicidade, também levaram a alguma redução da proliferação celular, o que poderá ser benéfico nomeadamente em terapia hormonal de cancros estrogénio-dependentes.

6. Perspetivas futuras

A investigação científica é um processo que pode ser considerado quase infinito, sem limite de tempo que lhe pode ser dedicado e de conhecimento que dela pode advir. Há sempre questões por responder e conceitos por aprofundar.

Relativamente ao trabalho que realizei, as principais metas que ficaram por atingir, e que considero relevante investir futuramente, foram:

- Na fase de síntese química, a obtenção de uma maior quantidade de produto na reação de nitro-oxidação do acetato de estrona com lactona no anel D, para a aquisição de dados adicionais de caracterização estrutural e também para avaliação biológica, uma vez que, tal como referido no ponto 1 do presente capítulo, a presença de uma lactona no anel D e de um grupo nitro-oxi em C11 deverão, teoricamente, dar origem a uma molécula que tem simultaneamente baixa estrogénicidade e atividade anti-proliferativa relevante, (caraterísticas atribuídas a cada um dos grupos funcionais respetivamente);

- Também na fase de síntese química, a purificação do composto obtido a partir da reação de introdução de uma dupla ligação entre os carbonos 9 e 11 do acetato de estrona com lactona no anel D, sem que haja degradação do mesmo, e posterior caracterização e avaliação biológica;

- Na fase de avaliação biológica, a obtenção de dados relativos ao efeito de todos compostos sintetizados na proliferação de células não cancerígenas, para comparação com os resultados obtidos em células tumorais e determinação da seletividade de ação de cada um,

- Também na fase de avaliação biológica, a realização de estudos mais aprofundados, nomeadamente a diferentes concentrações para obtenção de curvas dose-resposta e determinação de IC₅₀;

- E, ainda na fase de avaliação biológica, elucidar o processo de morte celular (apoptose/necrose) e os possíveis mecanismos de ação por citometria de fluxo, a potencial estrogénicidade dos compostos mais relevantes, e fazer, adicionalmente, estudos de estrutura-atividade por *docking* molecular.

7. Referências

1. Grupo Holon. Manual da qualidade Holon 2016. *Manuais Holon 1-15* (2016).
2. INFARMED. Decreto-Lei n.º 109/2014, de 10 de julho. *Legislação Farm. Compil.* (2014).
3. INFARMED. Deliberação 78/CD/2014. 2-3 (2014).
4. Grupo Holon. Manual de gestão Holon 2016. *Manuais Holon 1-38* (2016).
5. Instituto Português da Qualidade. Norma Portuguesa de Sistemas de Gestão da Qualidade - Requisitos (ISO 9001:2008). (2008).
6. Ministério da Saúde. Normas Relativas à Prescrição de Medicamentos e aos Locais de Prescrição, Farmácias e Administrações Regionais de Saúde. 19-22 (2003).
7. INFARMED. 166/CD/100.20.200: Registos de psicotrópicos e estupefacientes. *Circ. Inf.* (2015).
8. Grupo Holon. Manual de atendimento Holon 2016. *Manuais Holon 1-26* (2016).
9. Grupo Holon. Manuais Holon de consulta farmacêutica: cessação tabágica. *Manuais Holon 1-19* (2014).
10. DGS. Circular Normativa 26/DSPPS: Programa-tipo de atuação em cessação tabágica. 1-74 (2007).
11. Grupo Holon. Manuais Holon de consulta farmacêutica: serviço 'Respirar melhor'. *Manuais Holon 1-32* (2015).
12. Direção-Geral de Saúde. Abordagem e Controlo da Asma. *Norma da Direção-Geral da Saúde 1-14* (2012).
13. Direção-Geral de Saúde. Diagnóstico e Tratamento da Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica. *Norma da Direção-Geral da Saúde 1-15* (2013).
14. Grupo Holon. Manual de instruções Holon 2016. *Manuais Holon 1-14* (2016).
15. Grupo Holon. Manuais Holon: manual do projeto - intervenção da farmácia no cancro coloretal. *Manuais Holon 1-15* (2016).
16. Verrecchia, F., Sarrouilhe, D. & Hervé, J. C. Nongenomic steroid action: Inhibiting effects on cell-to-cell communication between rat ventricular myocytes. *Exp. Clin. Cardiol.* **6**, 124-31 (2001).
17. Payne, A. H. & Hales, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr. Rev.* **25**, 947-970 (2004).

18. Mendelsohn, M. E. & Karas, R. H. The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System. *N. Engl. J. Med.* **340**, 1801-1811 (1999).
19. Deroo, B. J. & Korach, K. S. Estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **116**, 561-570 (2006).
20. Piao, H., Chu, X., Lv, W. & Zhao, Y. Involvement of receptor-interacting protein 140 in estrogen-mediated osteoclasts differentiation , apoptosis , and bone resorption. *J. Physiol. Sci.* (2016). doi:10.1007/s12576-016-0447-2
21. Pratap, U. P. *et al.* Estrogen-induced neuroprotective and anti-inflammatory effects are dependent on the brain areas of middle-aged female rats. *Brain Res. Bull.* **124**, 238-253 (2016).
22. Rossetti, M., Cambiasso, M., Holschbach, A. & Cabrera, R. Estrogens and progestagens: synthesis and action in the brain. *J. Endocrinol.* **4** (2016). doi:10.1111/jne.12402
23. Siegel, R., Miller, K. & Jemal, A. Cancer statistics, 2015. *A Cancer J. Clin.* **65**, 5-29 (2015).
24. Elomrani, F. *et al.* Management of early breast cancer in older women : from screening to treatment. *Breast Cancer Targets Ther.* 165-171 (2015).
25. Santabarbaraa, G., Maionea, P., Rossi, A. E. & Gridelli, C. Pharmacotherapeutic options for treating adverse effects of Cisplatin chemotherapy. *Expert Opin. Pharmacother.* (2015).
26. Liu, F. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy - a quick review. *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* **48**, 239-244 (2009).
27. Lumachi, F., Santeufemia, D. A. & Basso, S. M. Current medical treatment of estrogen receptor-positive breast cancer. *World J. Biol. Chem.* **6**, 231-239 (2015).
28. Kerns, S. L. *et al.* The Prediction of Radiotherapy Toxicity Using Single Nucleotide Polymorphism Based Models: A Step Toward Prevention. *Semin. Radiat. Oncol.* 281-291 (2015).
29. Phan, C.-M., Liu, Y., Kim, B., Mostafa, Y. & Taylor, S. D. Inhibition of steroid sulfatase with 4-substituted estrone and estradiol derivatives. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 5999-6005 (2011).
30. Liu, Y., Kim, B. & Taylor, S. D. Synthesis of 4-formyl estrone using a positional protecting group and its conversion to other C-4-substituted estrogens. *J. Org. Chem.* **72**, 8824-8830 (2007).
31. Wilcken, N., Hornbuckle, J. & Gherzi, D. Chemotherapy alone versus endocrine therapy alone for metastatic breast cancer. *Cochrane database Syst. Rev.* (2003).

32. Thomas, M. P. & Potter, B. V. Estrogen O-sulfamates and their analogues: Clinical steroid sulfatase inhibitors with broad potential. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (2015).
33. Golubovskaya, L. E., Minailova, O. N. & Rzheznikov, V. M. Drug synthesis methods and manufacturing technology - A simple method of obtaining 11-keto-9b-estra-1,3,5(10)-trienes: potential reactants for the synthesis of steroidal antigestagens. *Pharm. Chem. J.* **36**, 507-509 (2002).
34. Peters, R. H., Crowe, D. F., Avery, M. A., Chong, W. K. M. & Tanabe, M. 11B-Nitrate Estrane Analogues: Potent Estrogens. *J. Med. Chem.* **32**, 2306-2310 (1989).
35. Rzheznikov, V. M., Golubovskaya, L. E., Minailova, O. N., Osetrova, I. P. & Smirnova, Z. S. Steroidal Nitrates: Synthesis and Antitumor Activity of of 9alpha, 11beta-Dihydroxyestra-1,3,5(10)-triene 11-nitrates. *Pharm. Chem. J.* **37**, 10-12 (2003).
36. G. Baldratti, W. Barbieri, A. C. & R. Sciaky, E. Scascia, G. K. S. Synthesis and Biological Activity of 9a-Hydroxy-11b-Nitro-1,3,5 (10)-Estratrienes; a New Class of Potent Estrogenic Steroids. *Specialia* **25**, 1018-1019 (1669).
37. Westerfeld, W. W. The Oxidation of Estrone by Hydrogen Peroxide. *J. Biol. Chem.* **143**, 177-184 (1942).
38. Jacobsen, R. P. Steroid Lactones: I. The oxidation of Estrone Acetate to the Lactone Acetate of Estrolic Acid. *J. Biol. Chem.* **171**, 61-71 (1947).
39. Chagonda, L. S., Lockey, P. M., Marples, B. A. & Traynor, J. R. Synthesis and Cytotoxic Activity of Estrogen a-Methylene-g-Lactones. *Steroids* **43**, 283-292 (1984).
40. Chagonda, L., Lockey, P. M., Marples, B. A., Salt, W. G. & Traynor, J. R. Cytotoxic action of Alpha-methylene lactones towards HeLa cells in culture. *Phyther. Res.* **3**, 196-200 (1989).
41. Minorics, R. *et al.* A molecular understanding of D-homoestrone-induced G2/M cell cycle arrest in HeLa human cervical carcinoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* **19**, 2365-2374 (2015).
42. Palomino, E., Heeg, M., Horwitz, J., Polin, L. & Brooks, S. Skeletal conformations and receptor binding of some 9,11 -modified estradiols. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **50**, 75-84 (1994).
43. Murugan, R. & Scriven, E. F. V. *Applications of Dialkylaminopyridine (DMAP) Catalysts in Organic Synthesis. Aldrichimica Acta* **36**, (2003).
44. Schwarz, S. *et al.* 17b-Hydroxy-11a-(3'-sulfanylpropyl)oxy-estra-1,3,5(10)-trien-3-yl sulfamate - a novel hapten structure: Toward the development of a specific enzyme immunoassay (EIA) for estra-1,3,5(10)-triene-3-yl sulfamates. *Steroids* **64** **64**, 460-471 (1999).

45. Garrido, M. *et al.* New steroidal lactones as 5 α -reductase inhibitors and antagonists for the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **127**, 367-73 (2011).
46. Grieco, P., Yokoyama, Y., Gilman, S. & Ohfuné, Y. Conversion of Ketones into Lactones with Benzeneseleninic Acid and Hydrogen Peroxide (Benzeneperoxyseleninic Acid): a New Reagent for the Baeyer-Villiger Reaction. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 870 - 871 (1977). doi:10.1039/C39770000870
47. Stephan, E., Zen, R., Authier, L. & Jaouen, G. Improved synthesis of a protected 11-oxoestrone. *Steroids* **60**, 809-811 (1995).
48. Djurendi, E., Jovanovi, S. & Koji, V. Synthesis of some epoxy and/or N-oxy 17-picolyl and 17-picolinylidene-androst-5-ene derivatives and evaluation of their biological activity. *Steroids* 129-138 (2007). doi:10.1016/j.steroids.2007.09.005
49. Riss, T. L., Nilas, A. L. & Minor, L. Cell Viability Assays. *Assay Guid. Man.* 1-5 (2015).

Anexos

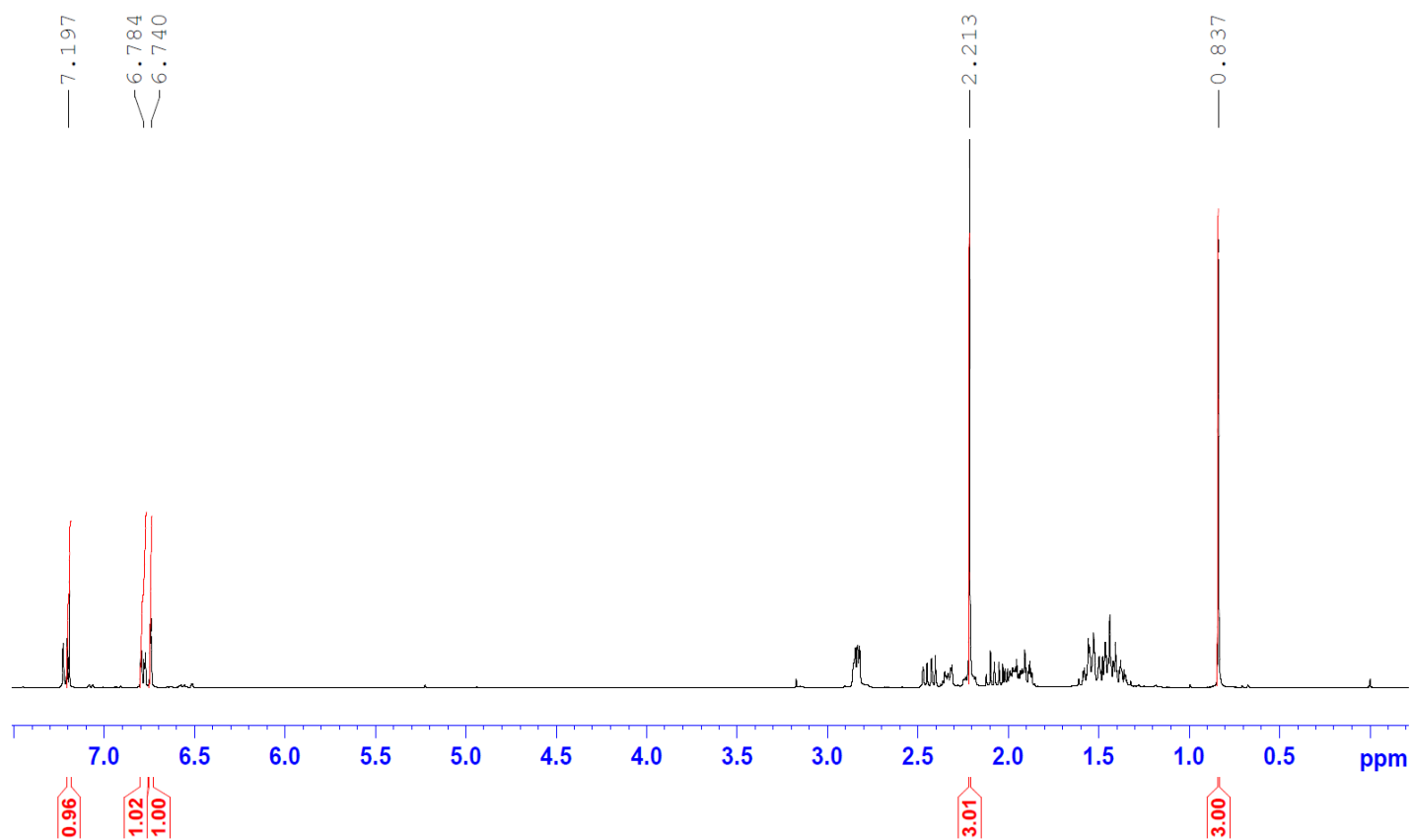


Figura 27 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de estrona produzida a partir da reação de acetilação.

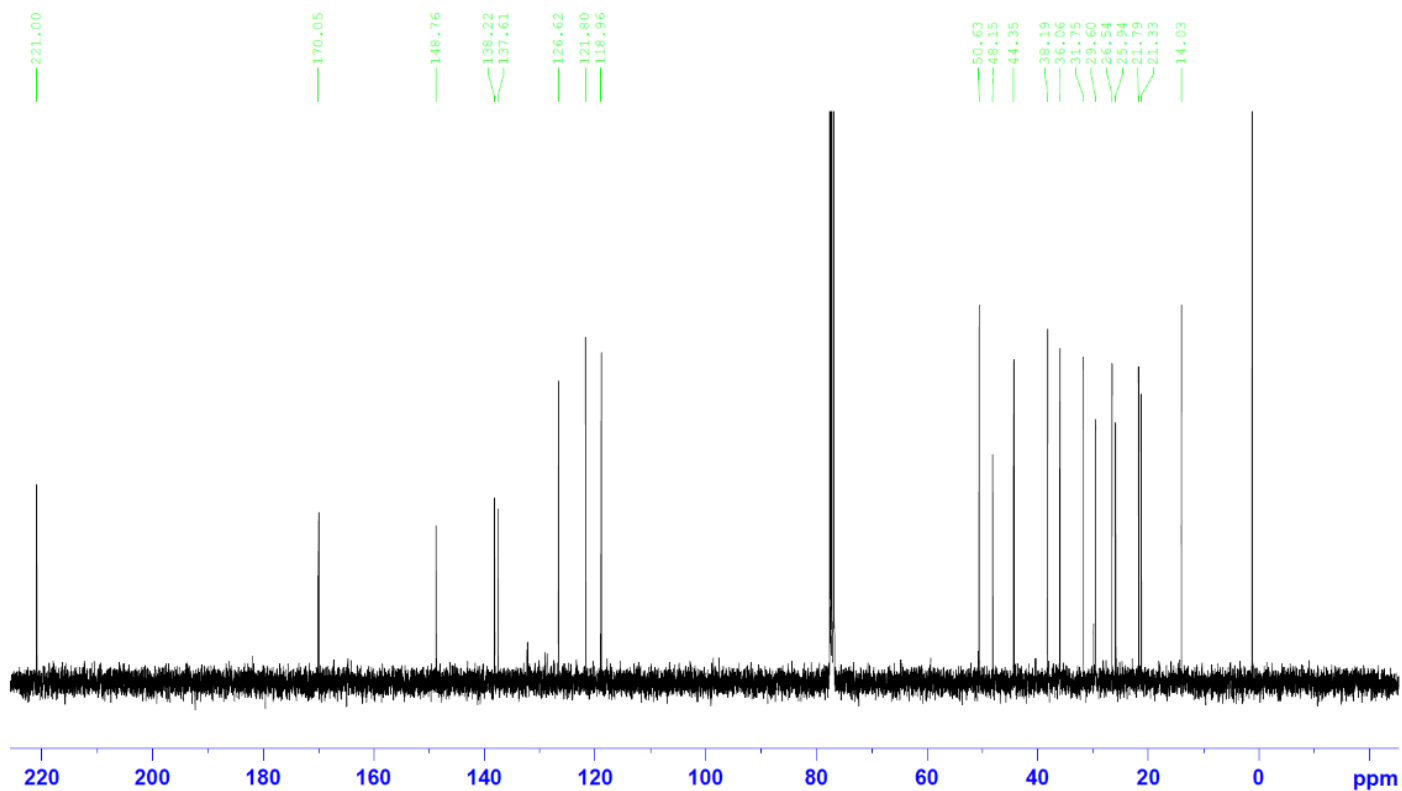


Figura 28 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) da molécula de acetato de estrona produzida a partir da reação de acetilação.

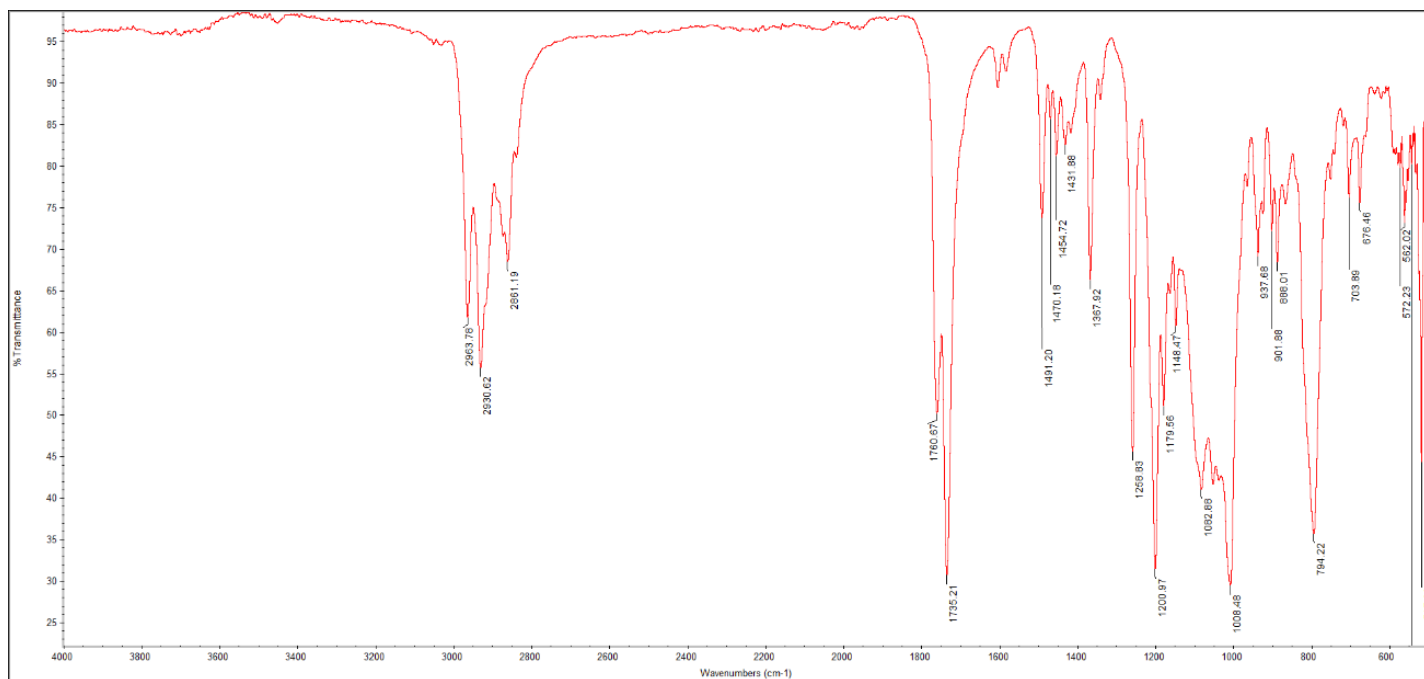


Figura 29 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de acetato de estrona produzida a partir da reação de acetilação.

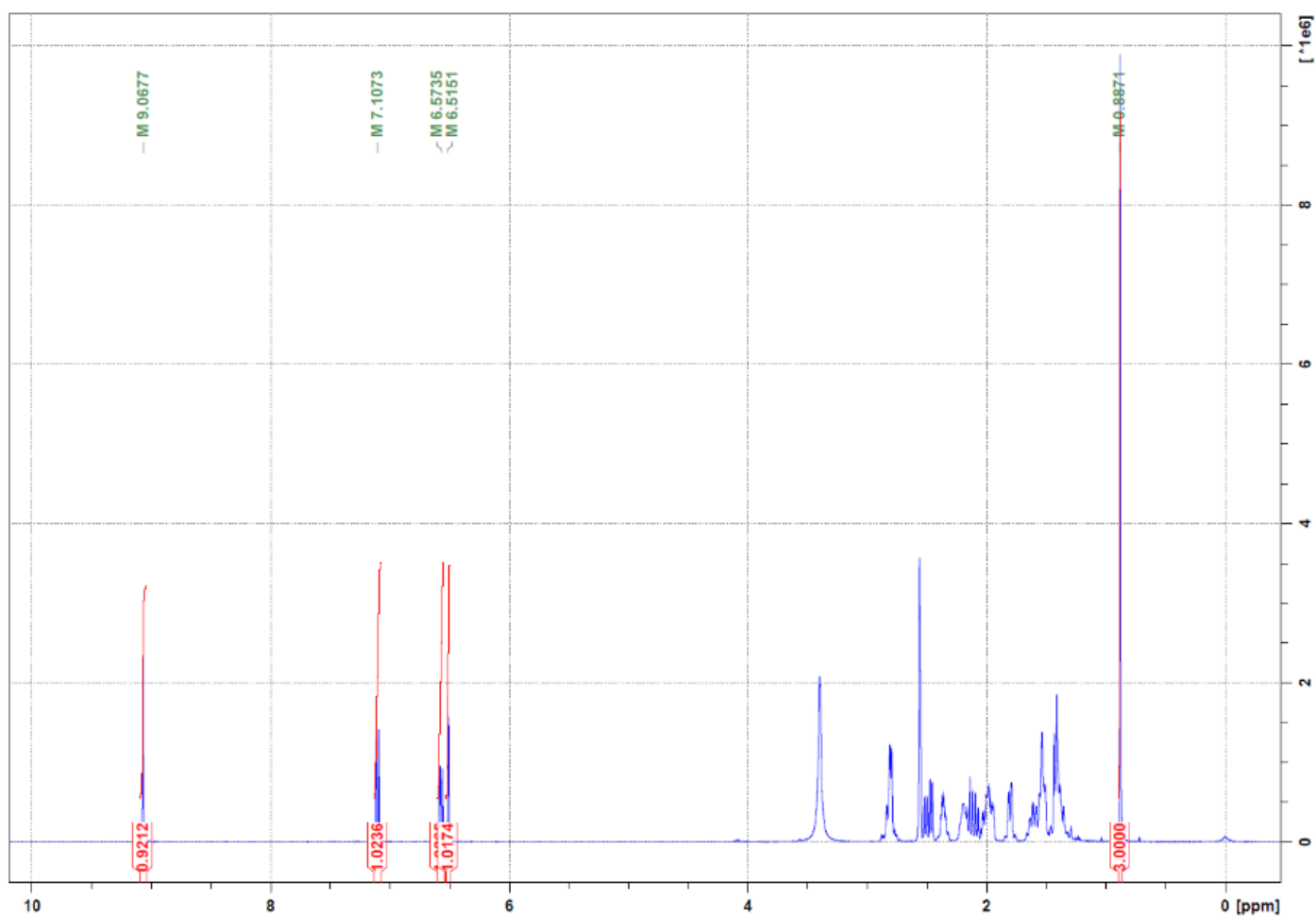


Figura 30 - Espectro ¹H RMN (DMSO, 400 MHz) da molécula de estrona produzida a partir das reações de hidrólise.

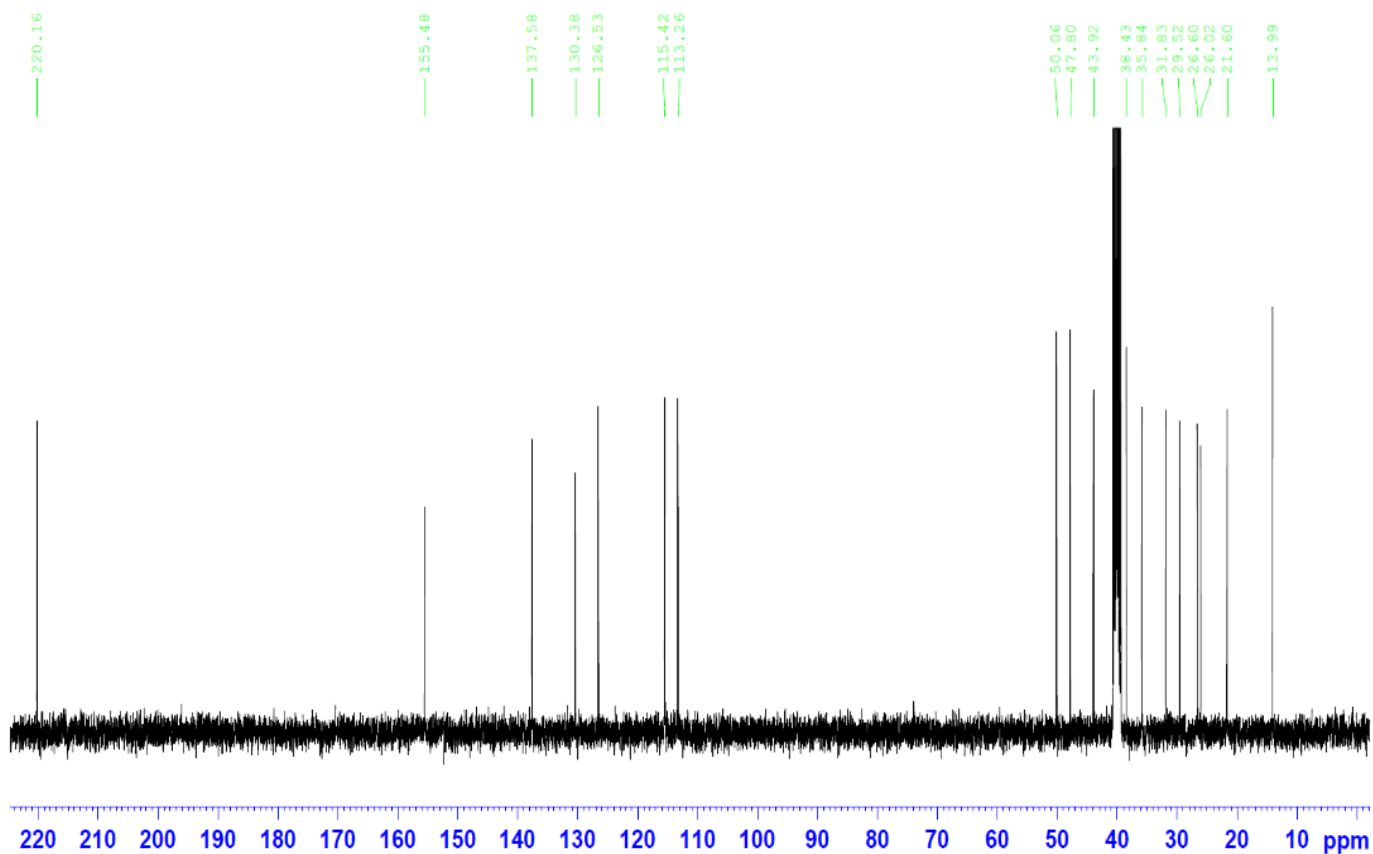


Figura 31 - Espectro ^{13}C RMN (DMSO, 100 MHz) da molécula de estrona produzida a partir das reações de hidrólise.

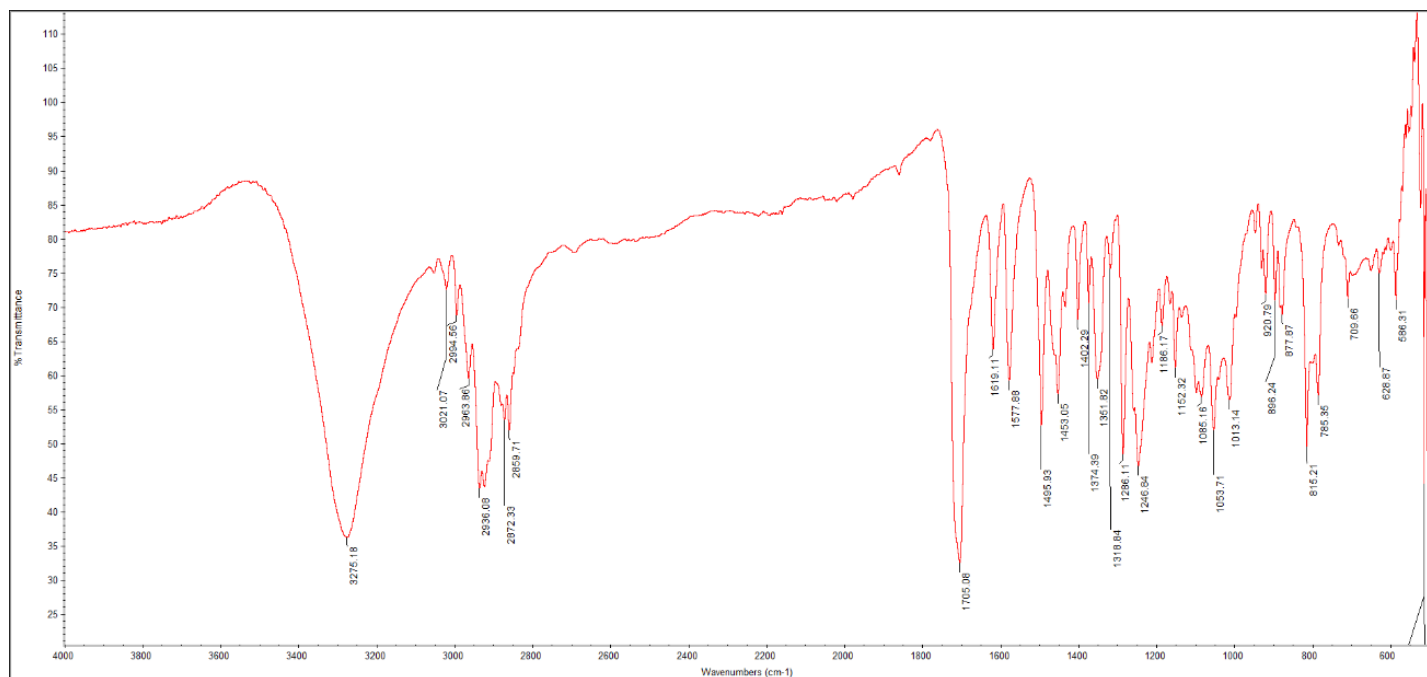


Figura 32 - Espectro IV (cm⁻¹) da molécula de estrona produzida a partir das reações de hidrólise.

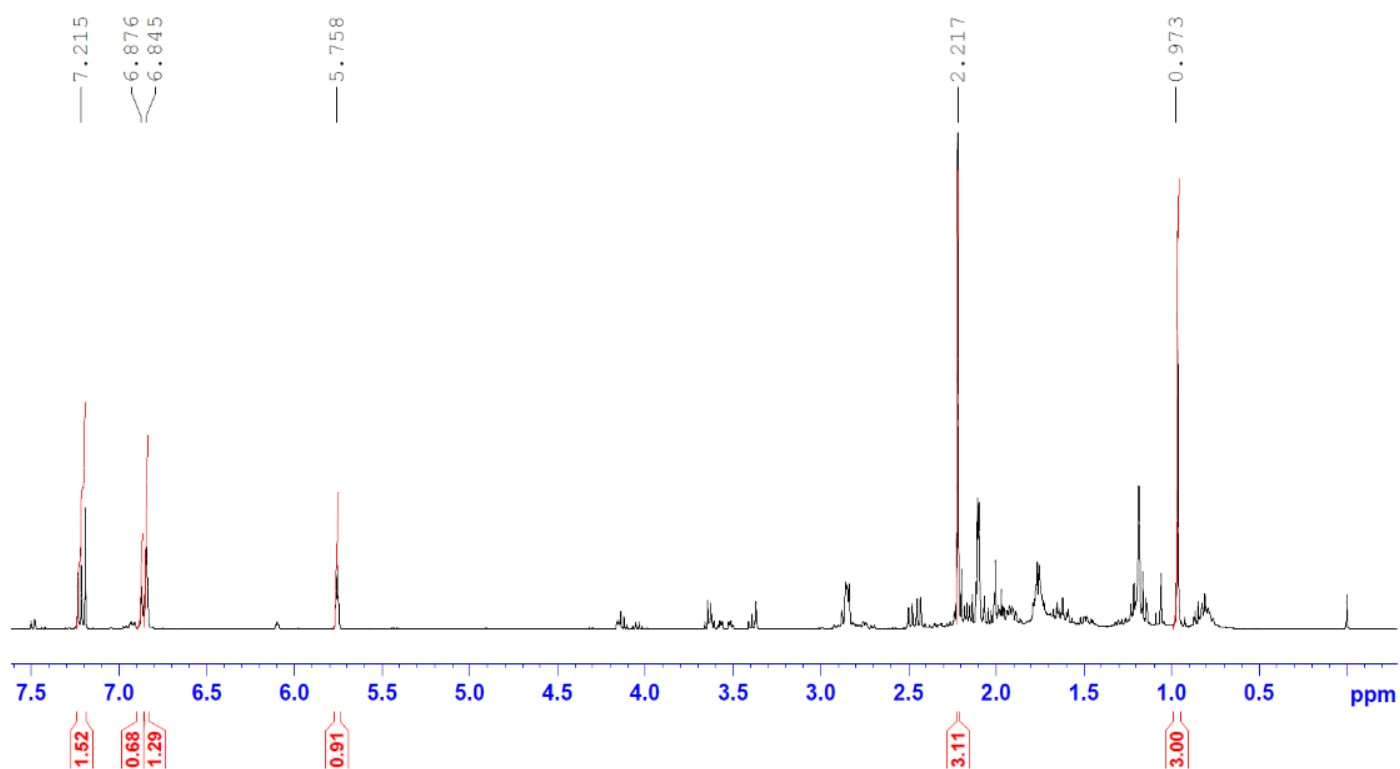


Figura 33 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 9α -hidroxi- 11β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo produzida a partir da reação com CAN.

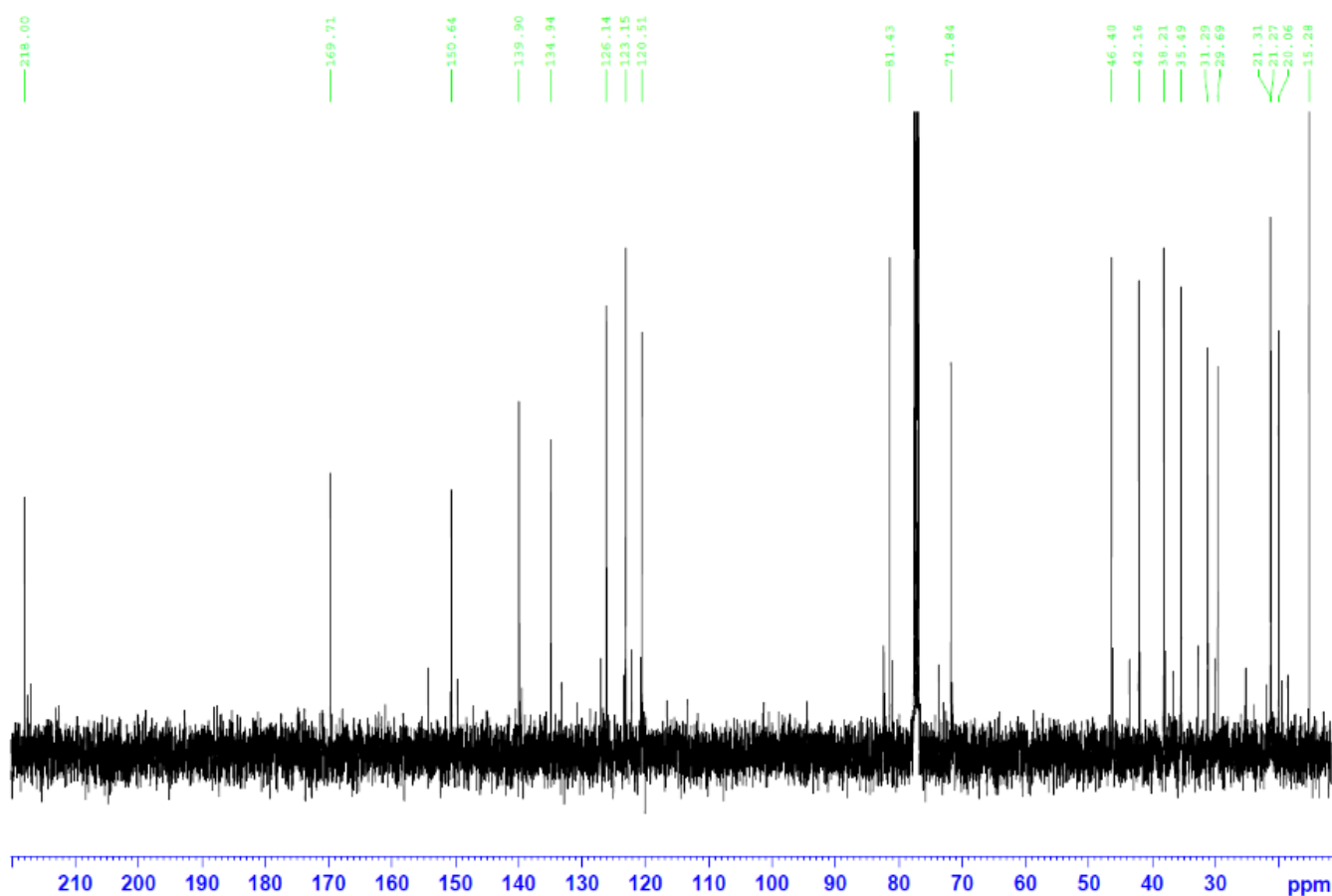


Figura 34 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) molécula de acetato de 9α -hidroxi- 11β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo produzida a partir da reação com CAN.

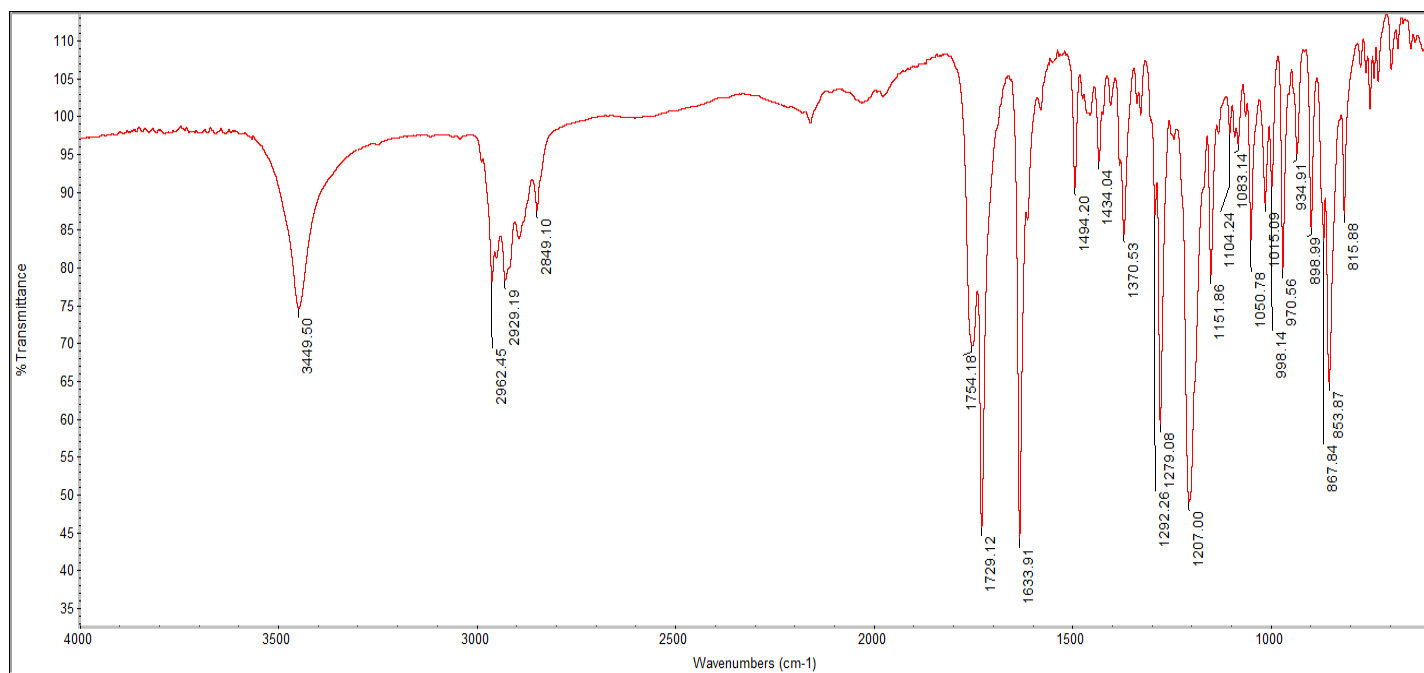


Figura 35 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de acetato de 9 α -hidroxi-11 β -nitrooxi-17-oxoestra-1,3,5(10)-trien-3-ilo produzida a partir da reação com CAN.

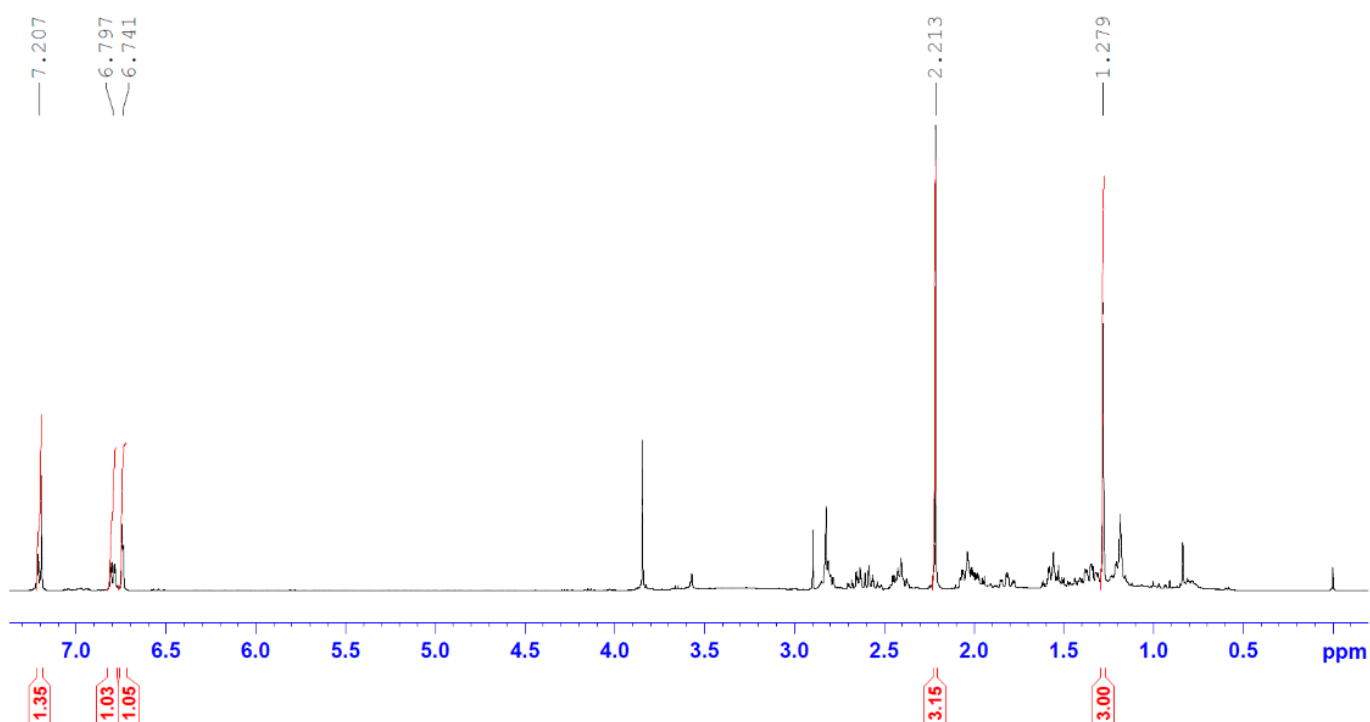


Figura 36 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo produzida a partir da reação de Baeyer-Villiger.

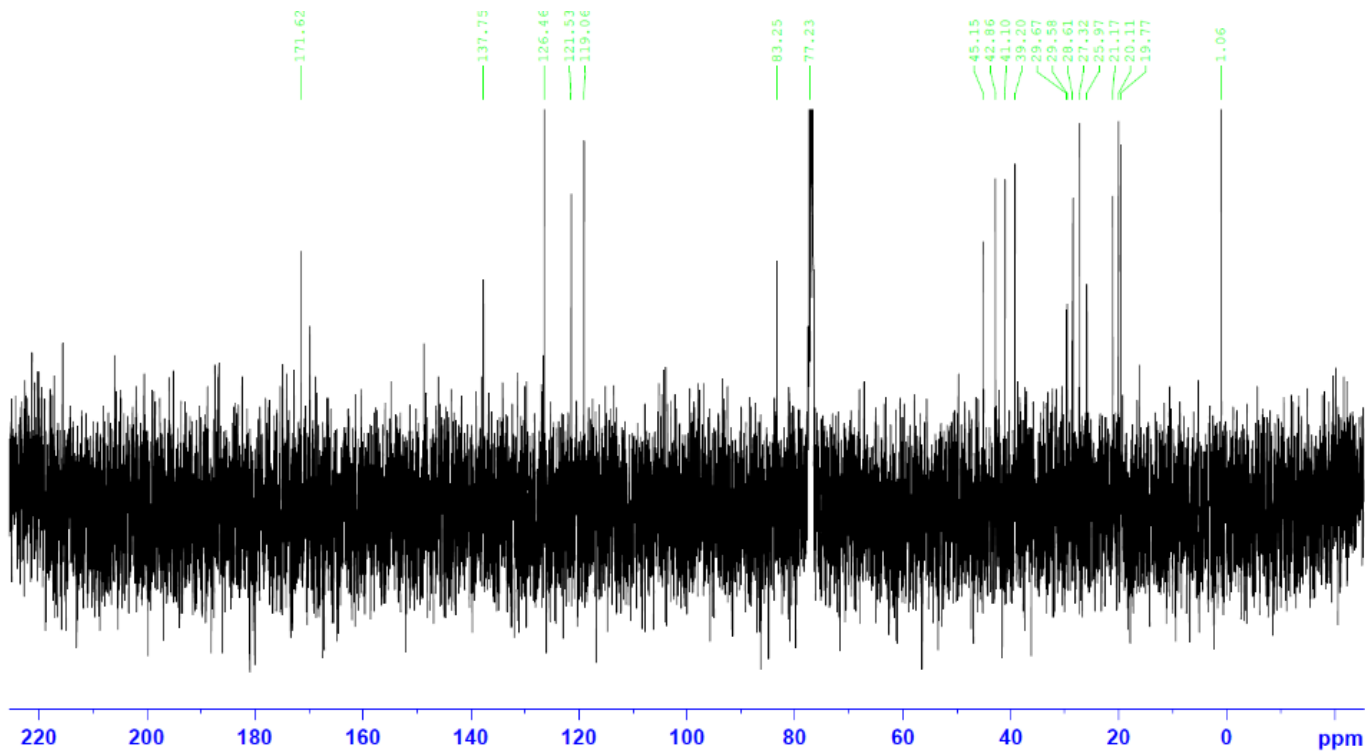


Figura 37 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)trien-3-ilo produzida a partir da reação de Baeyer-Villiger.

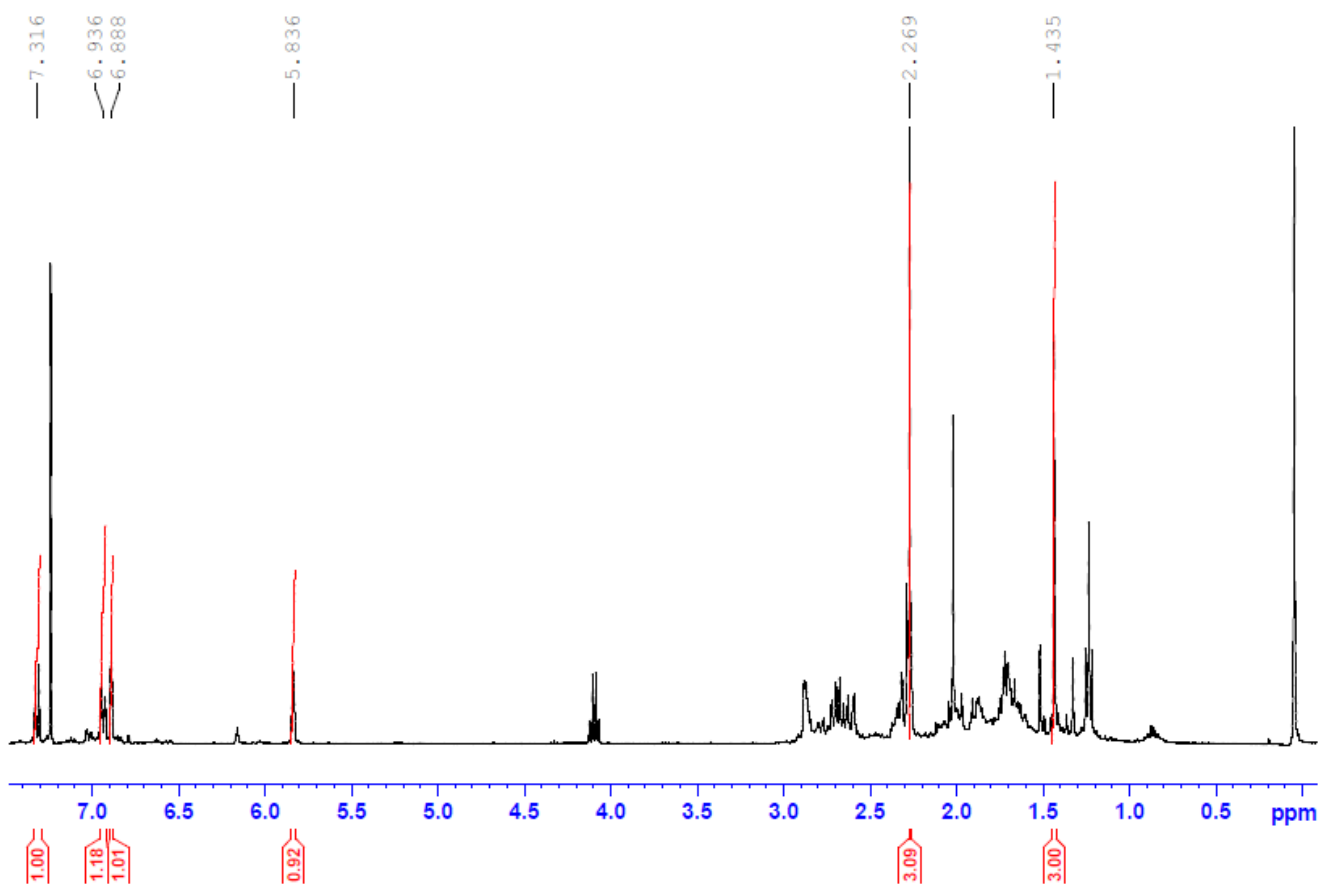


Figura 38 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 9 α -hidroxi-11 β -nitroxi-17 α -oxa-17-oxo-homoestra-1,3,5(10)tetraeno-3-ilo produzida a partir da reação com CAN.

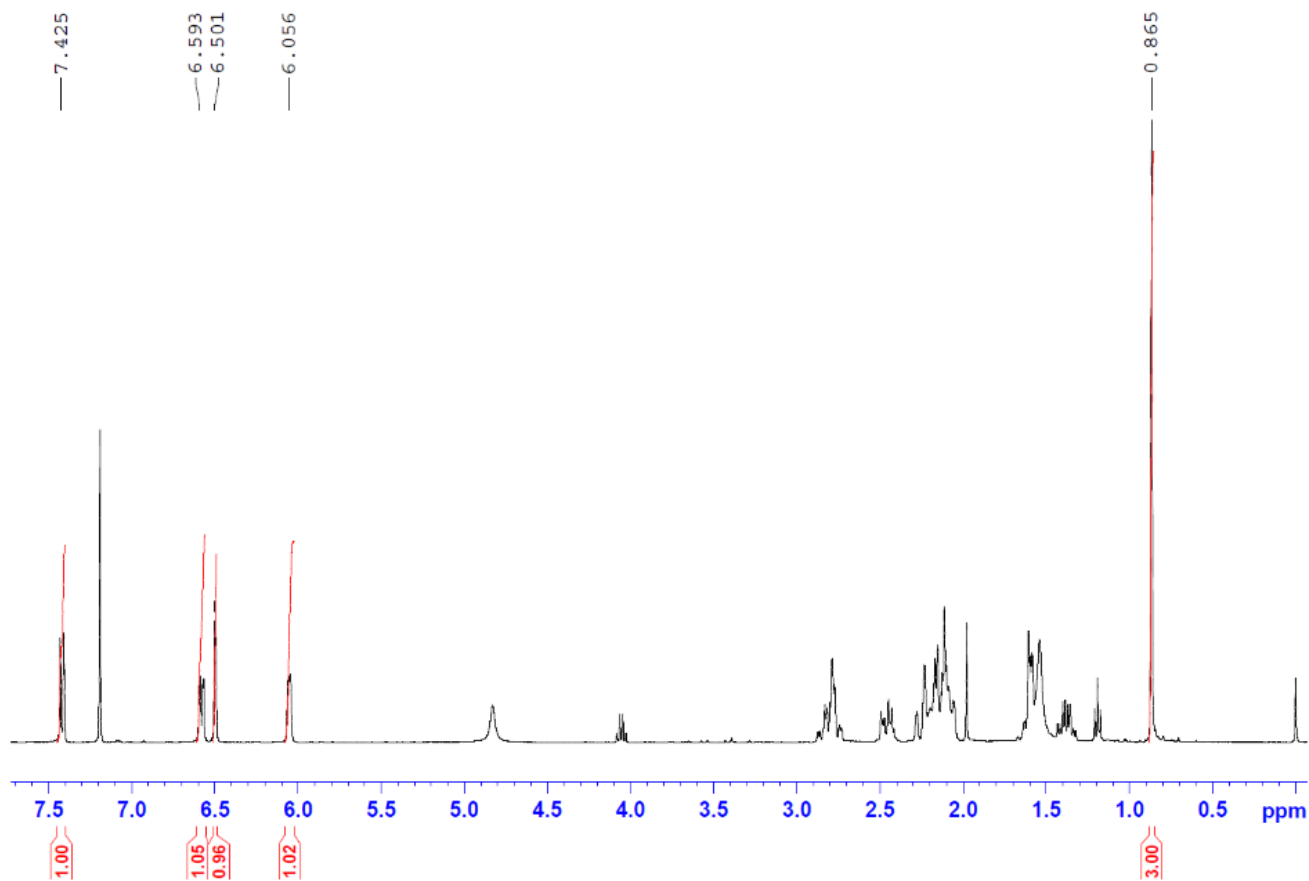


Figura 39 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona produzida a partir da reação com DDQ.

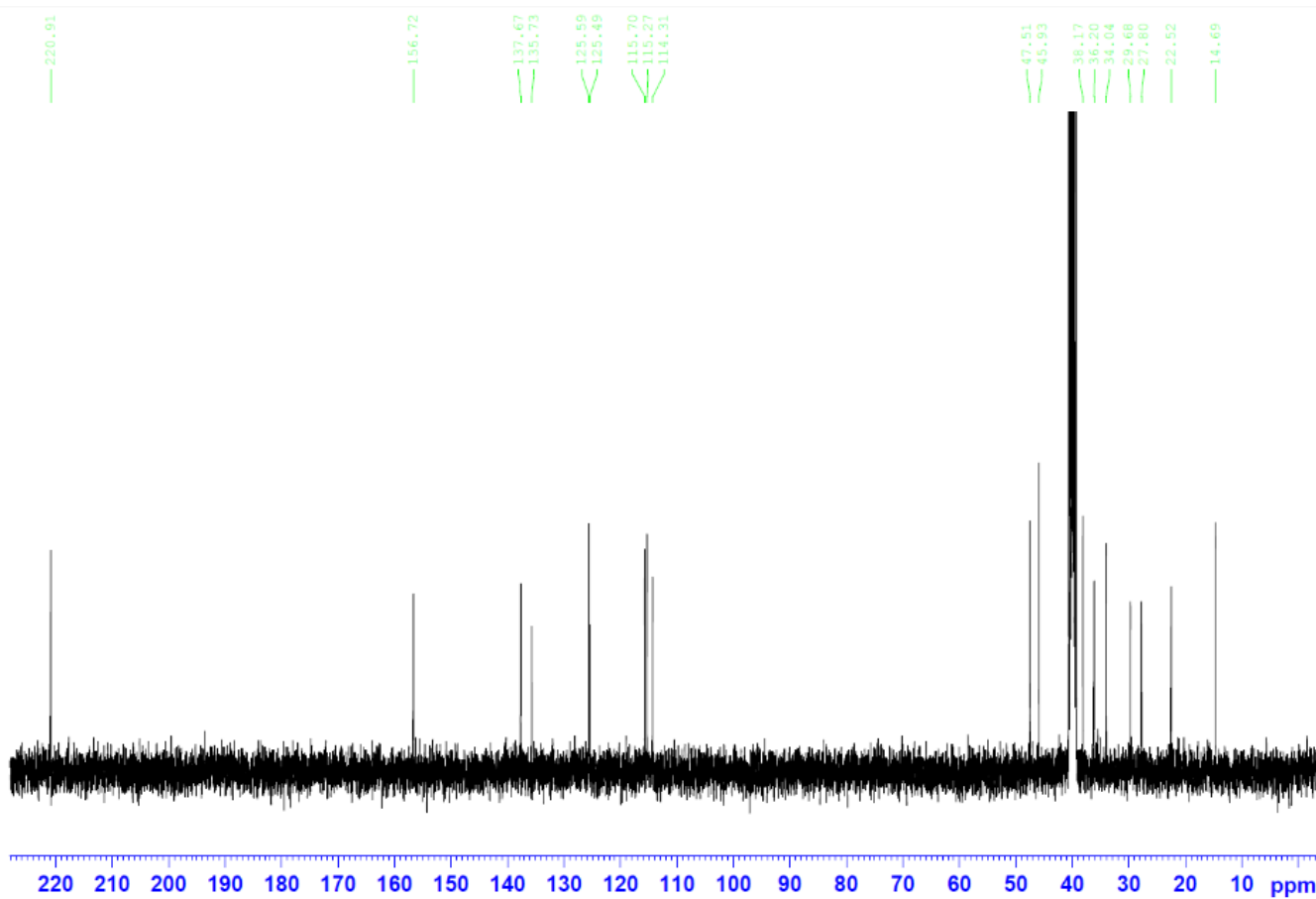


Figura 40 - Espectro ^{13}C RMN (DMSO , 100 MHz) da molécula de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona produzida a partir da reação com DDQ.

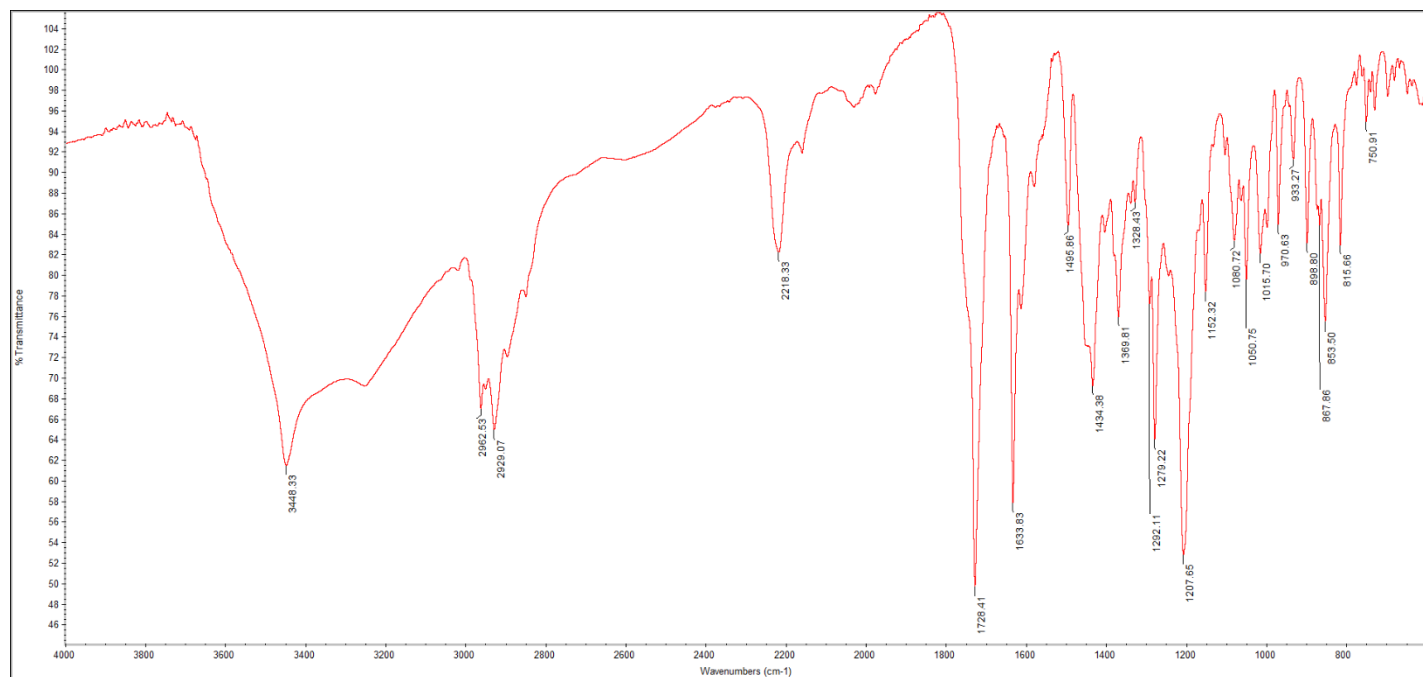


Figura 41 - Espectro IV (cm^{-1}) da molécula de 3-hidroxiestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-17-ona produzida a partir da reação com DDQ.

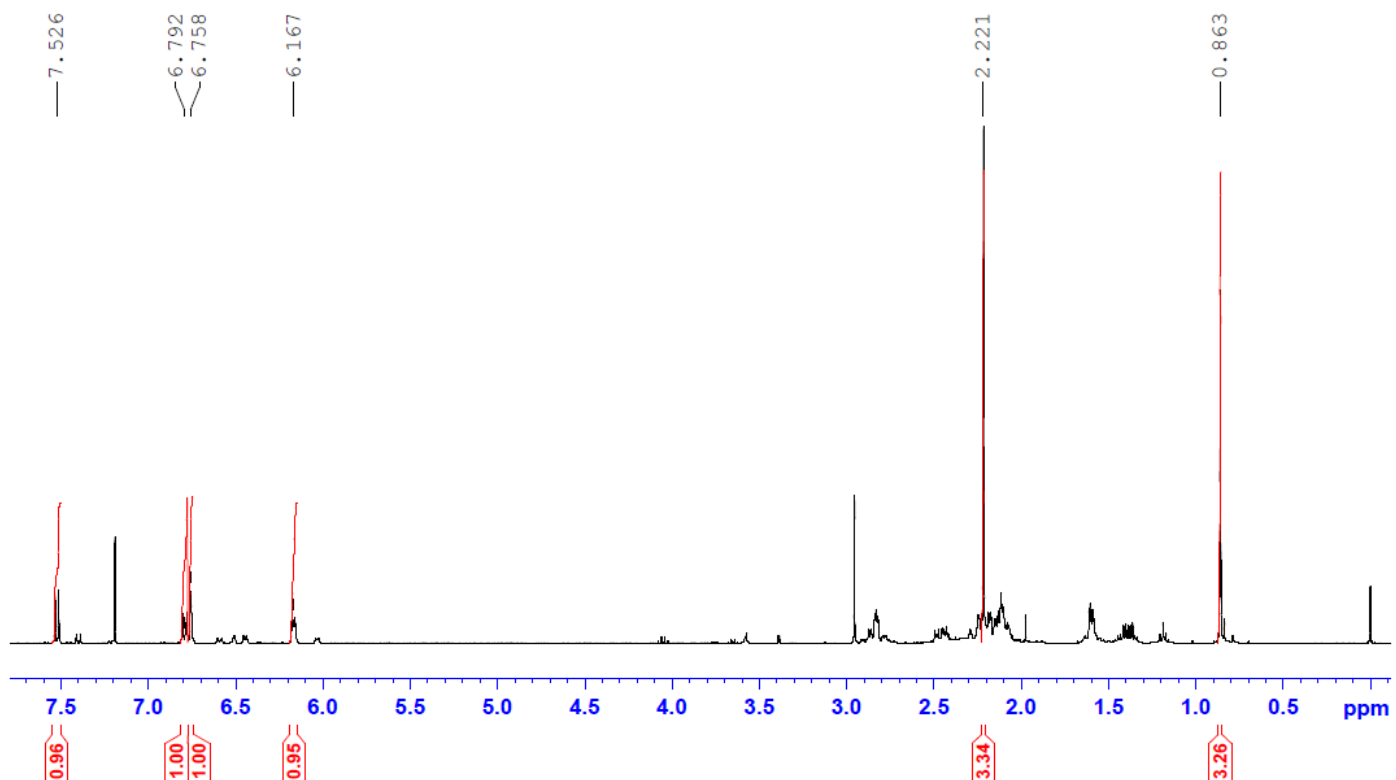


Figura 42 - Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) da molécula de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo produzida a partir da reação de acetilação.

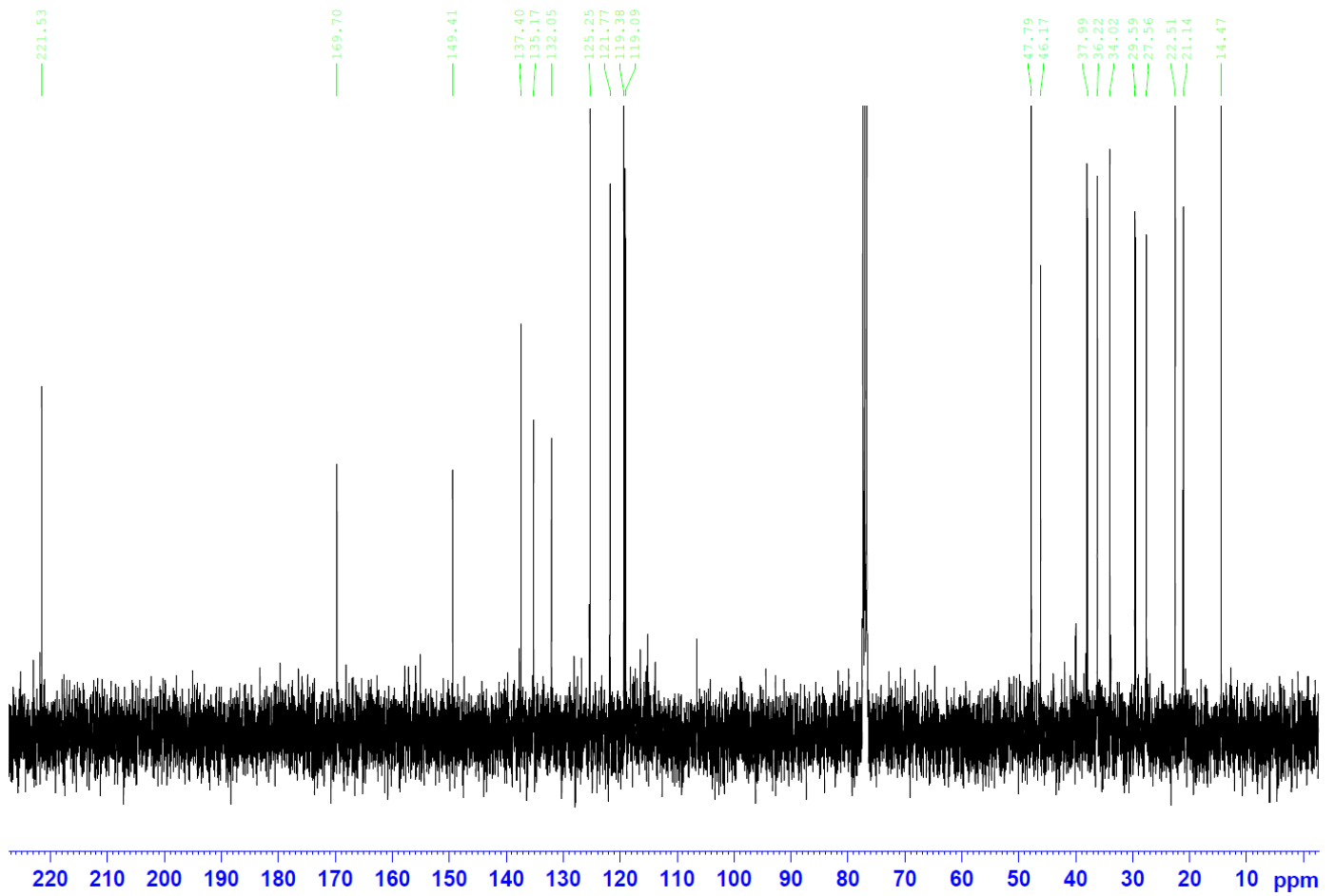


Figura 43 - Espectro ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz) da molécula de acetato de 17-oxoestra-1,3,5(10),9(11)-tetraen-3-ilo produzida a partir da reação de acetilação.