

**Influência da soja e do estrogénio na adesão
celular e na atividade da aromatase em células
MCF-7**
**Experiência profissionalizante na vertente de
Farmácia Comunitária e Investigação**

Inês Candeias Martins

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(mestrado integrado)

Orientadora: Professora Doutora Luíza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro
Co-orientadora: Mestre Micaela Carina Pereira Almeida
Co-orientadora: Mestre Mafalda Neto Soares

Setembro de 2020

Agradecimentos

Começo por agradecer à Professora Doutora Luíza Granadeiro pela orientação exemplar e rigorosa, total disponibilidade e pela troca de conhecimentos. Pela sua forma generosa de nunca ter permitido que o desalento se instalasse, mesmo quando existiam percalços pelo caminho. Agradeço ainda por acreditar nas minhas capacidades e por todo o apoio que me proporcionou desde o primeiro dia desta jornada.

Às minhas colegas de laboratório, Micaela e Mafalda, por todas as horas que partilhámos juntas, pela ajuda, clareza, rigor e total colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a toda a equipa da Farmácia Vitória pela experiência profissionalizante bastante enriquecedora que vivenciei.

Quero agradecer aos meus pais por me proporcionarem a oportunidade de seguir o caminho que sempre desejei, sem nunca expressarem receio da minha escolha. A toda a família fica o meu sincero obrigado pela compreensão, pelo incentivo para nunca desistir, apoio incondicional e por todo o carinho.

Ao meu irmão e à Patrícia agradeço genuinamente os conselhos sábios, o carinho e a dedicação que demonstraram ao longo da vida.

Ao Rui, pela paciência nas horas mais difíceis, pelo amor incondicional que ajudou a superar cada desafio e pela alegria de partilharmos cada vitória juntos.

Aos amigos que acompanharam esta caminhada lado a lado. Agradeço todo o companheirismo vivido, a troca de conhecimentos, as alegrias e dissabores que vivemos juntos e, o mais importante, os laços de amizade que se criaram.

Aos amigos de longa data, Catarina e Miguel, que souberam ouvir quando mais precisei de falar e que estiveram presentes em todas as etapas.

Por fim, mas não menos importante, à família que nós escolhemos, a todos os verdadeiros amigos que fizeram parte deste percurso, muito obrigada!

Resumo

O cancro da mama continua a ser uma das principais causas de morte entre as mulheres. Sabe-se que o tipo de dieta adotada é um dos fatores que contribui para potenciar o risco de desenvolvimento de cancro da mama hormono-dependente, influenciando não só o aparecimento como a progressão do mesmo.

O consumo de soja tem aumentado na alimentação ocidental. A soja é rica em fitoestrogénios, os quais apresentam semelhanças estruturais e funcionais com os estrogénios endógenos, permitindo-lhes interagir com os recetores de estrogénios (ER). Desta forma, podem ter um papel como substitutos hormonais, principalmente para mulheres em pós-menopausa.

Uma das estratégias para a terapia do cancro de mama pode passar pelo bloqueio da atividade da aromatase, enzima responsável pelos passos limitantes na biossíntese dos estrogénios. Desta forma, os inibidores da aromatase representam uma opção terapêutica na prática clínica.

O objetivo deste estudo consiste em compreender a influência dos compostos estrogénicos 17β -estradiol e de duas concentrações de extrato de soja, na adesão celular e na atividade da aromatase de células do cancro da mama MCF-7. De acordo com os objetivos propostos, a adesão celular foi avaliada através da determinação de proteínas totais nas amostras e a atividade específica da aromatase foi determinada por fluorescência na presença e ausência de um inibidor seletivo da aromatase (letrozol) com recurso ao *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit*.

Os resultados mostram que os compostos em estudo não impedem a adesão celular à superfície de crescimento, nomeadamente, a concentração mais elevada do extrato de soja estudada promoveu uma maior adesão celular. Quanto à atividade específica da aromatase verificou-se que níveis mais altos do extrato de soja não só aumentam a atividade desta enzima em células de cancro da mama, como diminuíram a eficácia do letrozol.

De acordo com estes resultados, pode-se concluir que as doses terapêuticas do letrozol podem não ser suficientes para inibir a aromatase na presença de soja. Desta forma, é relevante estar alerta, pois os suplementos à base de soja podem promover a resistência à terapêutica com letrozol.

Palavras-chave

Aromatase, cancro da mama, 17β -estradiol, extrato de soja, MCF-7, letrozol.

Abstract

Breast cancer remains one of the main causes of woman death. It is known that the type of diet is one of the factors to enhance the development of breast cancer risk, influencing cancer appearance but also its progression.

Soy consumption has increased in Western diet. Soy is rich in phytoestrogens which have structural and functional similarities with endogenous estrogens. The phytoestrogens interact with estrogen receptors (ER) and can be used as hormone substitutes mainly by postmenopausal women.

Aromatase activity inhibition can also be one of the strategies for breast cancer therapy, as this enzyme is responsible for limiting estrogens biosynthesis pathway. Thus, aromatase inhibitors are a potential therapeutic approach for clinical practice.

The aim of this study is to understand the influence of estrogenic compounds 17β -estradiol, and two concentrations of soy extract in cell adhesion and in the aromatase activity of MCF-7 breast cancer cells. For these goals different procedures were addressed, the cell adhesion was studied through the determination of total proteins in the samples and the specific aromatase activity was evaluated by fluorescence in presence and absence of selective aromatase inhibitor, letrozole, using *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit*.

The outcomes showed that 17β -estradiol and soy extract does not prevent the cell adhesion. In fact, the cells treated with the highest concentration of the soy extract showed greater cell adhesion. Concerning the specific aromatase activity, it was found that higher levels of soy extract promote the activity of this enzyme in breast cancer cells. Moreover, the effect of soy extract reduced the letrozole effectiveness.

The results suggest that the therapeutic doses of letrozole may not be enough to inhibit the aromatase activity in presence of soy extracts compounds. Thus, it is important to be alert because soy-based supplements can promote letrozole therapy resistance.

Keywords

Aromatase, breast cancer, 17β -estradiol, soy extract, MCF-7, letrozole.

Índice

Capítulo 1 – Influência da soja e do estrogénio na adesão celular e na atividade da aromatase em células MCF-7

1. Introdução.....	1
1.1. Cancro da mama	1
1.2. Estrogénios.....	1
1.2.1. Biossíntese dos estrogénios	2
1.2.2. Metabolismo dos estrogénios.....	4
1.2.3. Recetores de estrogénios	5
1.2.3.1. Estrutura dos recetores ER- α e o ER- β	6
1.2.4. Mecanismos moleculares de ação dos estrogénios	7
1.2.5. O Papel dos estrogénios no cancro.....	8
1.3. Aromatase.....	9
1.3.1. Terapia do Cancro da mama - Inibidores da Aromatase.....	10
1.4. Soja.....	12
1.4.1. Fitoestrogénios	13
1.4.2. Isoflavonas da Soja.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Materiais e Métodos	18
3.1. Reagentes	18
3.2. Linha celular	18
3.3. Compostos a testar.....	18
3.4. Equipamentos e materiais	18
3.5. Cultura celular.....	19
3.6. Preparação do meio de cultura - DMEM.....	19
3.7. Preparação dos compostos a testar	20
3.7.1. Preparação das soluções de 17 β -estradiol	20
3.7.2. Preparação das soluções de extrato de soja	21
3.8. Justificação das concentrações a testar	22

3.9. Contagem de células	22
3.10. Ensaios realizados para avaliar a adesão celular e a atividade enzimática em culturas de células <i>in vitro</i>	23
3.10.1. Procedimento geral para os dois ensaios	23
3.10.2. Ensaio de doseamento de proteínas pelo método BCA	23
3.10.3. Ensaio de determinação da atividade enzimática da aromatase.....	24
3.10.3.1. Preparação das soluções.....	25
3.10.3.2. Preparação da curva de calibração	26
3.10.3.3. Preparação das amostras e realização do ensaio	27
3.10.4. Cálculo da Atividade Específica da Aromatase.....	29
4. Análise e discussão de resultados	32
4.1. Doseamento de Proteínas Totais pelo método BCA e Adesão celular	32
4.2. Determinação da Atividade da Aromatase em células MCF-7.....	34
5. Conclusões e perspetivas futuras	39
6. Referências bibliográficas	40
Capítulo II – Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária	
1. Introdução	45
1.1. Contextualização da legislação farmacêutica	45
2. Organização da Farmácia.....	46
2.1. Localização e horário de funcionamento	46
2.2. Caracterização do espaço.....	46
2.3. Recursos Humanos.....	48
2.4. Recursos informáticos	49
3. Informação e documentação científica	49
4. Aprovisionamento e armazenamento	50
4.1 Seleção de um fornecedor	51
4.2 Encomendas	52
4.2.1 Receção de encomendas	53
4.2.2 Devolução de produtos.....	54

4.3 Armazenamento.....	54
5. Dispensa de medicamentos	56
5.1 Medicamentos Sujeitos a Receita Médica	56
5.2 Medicamentos Sujeitos a Receita Médica em Urgência	58
5.4 Medicamentos Genéricos.....	60
5.5 Regimes de Participação.....	60
5.6 Dispensa de Produtos de saúde ao abrigo de um protocolo	61
6. Automedicação vs Dispensa por Indicação Farmacêutica	61
6.1 Dispensa de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica.....	61
7. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde	62
7.1 Produtos de Dermofarmácia, cosmética e higiene	63
7.2 Produtos dietéticos infantis e para alimentação especial	63
7.3 Medicamentos fitoterapêuticos e suplementos nutricionais	64
7.4 Medicamentos de uso veterinário.....	64
7.5 Dispositivos médicos.....	65
8. Preparação de medicamentos	65
9. Farmacovigilância	68
10. Serviços adicionais.....	69
11. Programa Troca de Seringas	70
12. VALORMED.....	71
13. Cartão Farmácias Portuguesas	71
14. Contabilidade e Gestão	72
15. Outras atividades	73
16. Pandemia Covid-19 e as suas influências na farmácia comunitária.....	75
17. Considerações finais.....	78
18. Referências Bibliográficas.....	79
19. Anexos.....	81

Lista de Figuras

Capítulo 1 – Influência da soja e do estrogénio na adesão celular e na atividade da aromatase em células MCF-7

Secção 1- Introdução

Figura 1. Estruturas químicas da Estrona, Estradiol, Estriol e Estetrol.

Figura 2. Biossíntese dos estrogénios.

Figura 3. Representação esquemática dos diferentes domínios dos recetores de estrogénio nucleares alfa e beta.

Figura 4. Vias de sinalização dos estrogénios.

Figura 5. Papel dos estrogénios na carcinogénese.

Figura 6. Estrutura química dos inibidores da aromatase: Exemestano, Letrozol e Anastrozol.

Figura 7. Síntese de estrogénios na pré- e pós-menopausa e mecanismo de ação dos inibidores da aromatase.

Figura 8. Estruturas químicas de diversos fitoestrogénios.

Figura 9. Conversão das formas glicosídicas da genisteína e daidzeína.

Secção 2 – Materiais e Métodos

Figura 10. Preparação das soluções intermédias de 17 β -estradiol.

Figura 11. Preparação da solução de 17 β -estradiol 2nM.

Figura 12. Preparação da solução inicial de extrato de soja 175 μ g/ μ L.

Figura 13. Preparação das soluções intermédias de extrato de soja 87,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 21,875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 14. Preparação da solução trabalho de extrato de soja 0,0875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 15. Preparação da solução trabalho de extrato de soja 0,021875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 16. Reação de conversão do substrato fluorogénico da aromatase no metabolito fluorescente.

Figura 17. Preparação da solução de *Fluorescence Standard* 0,5 μM .

Figura 18. Representação esquemática da placa *multiwell* de 96 poços para a determinação da atividade específica da aromatase.

Lista de Gráficos

Capítulo 1 – Influência da soja e do estrogênio na adesão celular e na atividade da aromatase em células MCF-7

Secção 2 – Materiais e Métodos

Gráfico 1. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase.

Gráfico 2. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na ausência do inibidor da aromatase e na presença dos compostos em estudo 17β -Estradiol 2nM, Extrato de Soja 0,021875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e Extrato de Soja 0,0875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Gráfico 3. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença do inibidor da aromatase e dos compostos em estudo, 17β -Estradiol 2nM, Extrato de Soja 0,021875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e Extrato de Soja 0,0875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Secção 3- Análise e discussão dos resultados

Gráfico 4. Curva de calibração do Ensaio de Doseamento de Proteínas Totais.

Gráfico 5. Percentagem de adesão celular das células MCF-7 tratadas apenas com meio de cultura (controlo), 17β -Estradiol 2nM, Extrato de Soja 0,021875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e Extrato de Soja 0,0875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ comparativamente às células iniciais, Controlo To.

Gráfico 6. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase nas células MCF-7 tratadas com 17β -Estradiol 2nM.

Gráfico 7. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase nas células MCF-7 tratadas com Extrato de Soja 0,021875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Gráfico 8. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase nas células MCF-7 tratadas com Extrato de Soja 0,0875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Gráfico 9. Curva de calibração da atividade específica da Aromatase.

Gráfico 10. Atividade Específica da Aromatase em células MCF-7.

Lista de Tabelas

Capítulo 1 – Influência da soja e do estrogénio na adesão celular e na atividade da aromatase em células MCF-7

Tabela 1- Concentrações das soluções de extrato de soja preparadas e concentrações em contacto com as células

Tabela 2. Constituição do *Aromatase (CYP19A) Activity Assay Kit* para o ensaio de determinação da atividade enzimática da aromatase.

Tabela 3. Concentração de proteínas totais e percentagem de adesão celular para cada amostra.

Lista de acrónimos e abreviaturas

17 β -HSD	17 β -hidroxiesteroide desidrogenase
3 β -HSD	3 β -hidroxiesteroide desidrogenase
4-OHE2	4-hidroxiestradiol
6-OH-O-DMA	6-hidroxi-O-desmetilangolensina
6-PGD	6-fosfogluconolactona
AF-1	Função de Ativação autónoma 1
AF-2	Função de ativação 2
AKT	Proteína cinase B
ANF	Associação nacional das farmácias
AP-1	Proteína ativadora
BAFs	Fibroblastos adiposos da mama
BCA	Ácido bicinconínico
cAMP	Adenosina monofosfato cíclica
CEDIME	Centro de informação do medicamento e intervenções em saúde
CIM	Centro de informação do medicamento
CNP	Código nacional do produto
COMT	Catecol-O-metiltransferase
CPR	NADPH-citocromo P450 redutase
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DCI	Denominação comum internacional
DGAV	Direção geral de alimentação e veterinária
DHD	Dihidrodaidzeína
DHEA	Dihidroepiandrosterona
DHG	Dihidrogenisteína
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
E4	Estetrol
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ER	Recetores de estrogénio
ERE	Elementos de resposta ao estrogénio
ERK	Cinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigénio
ER- α	Recetores de estrogénio alfa
ER- β	Recetores de estrogénio beta
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FBS	Soro Bovino Fetal
FMN	Mononucleótido de flavina
FP	Farmacopeia Portuguesa
FSH	Hormona folículo estimulante

G6P	Glicose 6-fosfato
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GnRH	Hormona libertadora de gonadotrofinas
GPER1 ou GPR30	Recetor de estrogénio acoplado à proteína G
H295R	Células de adenocarcinoma humano
IA	Inibidores da Aromatase
IVA	Imposto sobre o valor acrescentado
LAF	Linha de apoio ao farmacêutico
LDB	Domínio de ligação ao ligando
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormona luteinizante
MAPK	Proteína cinase ativada por mitogénio
MCF-7	Linha celular de adenocarcinoma mamário (Michigan Cancer Foundation)
MCF-7aro	Linha celular de cancro da mama com sobreexpressão da aromatase
MNSRM	Medicamento não sujeito a receita médica
MNSRM-EF	MNSRM dispensa exclusiva em farmácia
MSRM	Medicamento sujeito a receita médica
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NTD	Domínio amino-terminal
O-DMA	O-desmetilangolensina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinase
PKC	Proteína cinase C
PNV	Plano nacional de vacinação
PVF	Preço de venda à farmácia
PVP	Preço de venda ao público
PIM	Preparação individual da medicação
RAM	Reação adversa ao medicamento
SARS-CoV-2	Síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2
SERM	Modelador seletivo dos recetores de estrogénio
SP-1	Proteína de especificidade
SPD	Sistemas personalizados de dispensação
StAR ou STARD1	Proteína reguladora aguda estrogénica
TAM	Tamoxifeno
THS	Terapia hormonal de substituição
TNF- α	Fator de necrose tumoral
UCC Fundão	Unidade de cuidados na comunidade do Fundão
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
β -NADP+	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado.

Capítulo 1 – Influência da soja e do estrogénio na adesão celular e na atividade da aromatase em células MCF-7

1. Introdução

1.1. Cancro da mama

O cancro da mama é uma doença que afeta principalmente mulheres, apesar de, poder manifestar-se também em homens (1–3). Além de ser o tipo de cancro mais comum em mulheres, é considerado, também, a principal causa de morte feminina em todo o mundo, representando cerca de 15% de todas as mortes provocadas por doenças oncológicas (1). Todos os anos, são diagnosticados cerca de 1,7 milhões de novos casos de cancro da mama e a tendência é que este número continue a aumentar (1,2,4). No entanto, em mulheres já diagnosticadas, a taxa de mortalidade tem vindo a diminuir, sobretudo devido ao desenvolvimento tecnológico e científico realizado nesta área, nomeadamente através da implementação de programas de rastreio, de técnicas de confirmação do diagnóstico clínico mais específicas e de terapêuticas mais direcionadas a cada tipo de cancro (1,4,5).

Vários fatores de risco têm sido relacionados com o aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de cancro da mama (1,4). Dentro destes salientam-se os fatores não modificáveis como a idade, a genética, e a menopausa tardia, entre outros, e fatores relacionados com o estilo de vida, tais como a alimentação e o uso de estrogénios exógenos como contraceptivos e como terapia hormonal de substituição (THS). Este último fator é preponderante para o desenvolvimento e proliferação do cancro da mama hormono-dependente (4,5).

1.2. Estrogénios

Os estrogénios são hormonas esteroides, derivadas do colesterol, responsáveis por diversas funções na fisiologia humana. Estão envolvidos na regulação da densidade óssea, das funções cerebrais, do metabolismo, da mobilização do colesterol, do sistema cardiovascular, controlam a inflamação, o crescimento e a diferenciação celular, além de contribuírem para o desenvolvimento de características sexuais secundárias (6,7).

Contudo, outros estudos demonstram que a exposição prolongada a estrogénios ao longo da vida tem sido associada a um risco aumentado de desenvolvimento de cancro da mama

em mulheres em pós-menopausa. (5). Os estrogénios contribuem para o desenvolvimento e proliferação do cancro da mama hormono-dependente, uma vez que conseguem regular positivamente genes anti-apoptóticos, como Bcl-2 e Bcl-xL e inibir a apoptose de células malignas ao regularem negativamente a expressão de genes pró-apoptóticos como o TP53 (p53) (8–10).

A nível estrutural os estrogénios são também conhecidos como esteróides C18, dado que a sua estrutura é composta por quatro anéis fundidos – 1 anel aromático com um grupo hidroxilo, 2 anéis ciclohexano e um anel ciclopentano - contendo 18 carbonos. O termo estrogénios engloba quatro compostos químicos: estrona (E1), estradiol (E2 ou 17 β -estradiol), estriol (E3) e estetrol (E4) (Figura 1). Apesar da estrutura base ser idêntica, o E1 apresenta um grupo cetona no C17, o E2 um grupo hidroxilo na mesma posição, o E3 apresenta mais um grupo hidroxilo no C18, enquanto que o estetrol apresenta três grupos hidroxilos nas posições C17, C18 e C19.

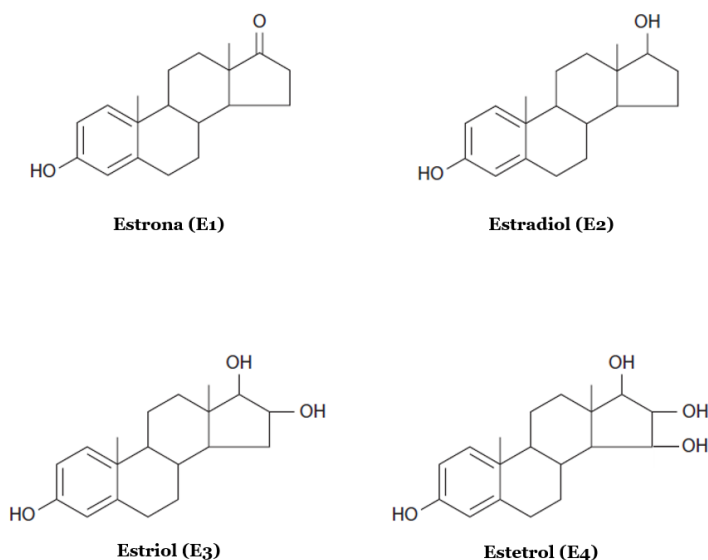


Figura 1. Estruturas químicas da Estrona, Estradiol, Estriol e Estetrol. Adaptado de Liang e Fuentes (6,10).

1.2.1. Biossíntese dos estrogénios

A biossíntese dos compostos estrogénicos ocorre em diversos tecidos e varia consoante o período hormonal (pré- ou pós-menopausa). Nas mulheres em pré-menopausa a esteroidogénese ocorre essencialmente nos ovários, mais precisamente nas células da teca e da granulosa, embora também ocorra em menor quantidade nos tecidos periféricos. Em mulheres em pós-menopausa a biossíntese tem lugar principalmente em locais extra-gonadais como a mama, fígado, tecido adiposo, pele e glândulas adrenais (6,11,12).

Os estrogénios são hormonas lipofílicas, pouco solúveis circulando na corrente sanguínea ligados, reversivelmente, a proteínas transportadoras como a albumina e a globulina de ligação a hormonas sexuais. Os seus efeitos nos tecidos e células alvo apenas são alcançados através da difusão das formas livres de estrogénio (5).

A produção de hormonas estrogénicas ocorre em resposta ao aumento dos níveis fisiológicos da hormona folículo estimulante (FSH) e da hormona luteinizante (LH) (8).

Para se iniciar a via metabólica dos estrogénios é necessário a captação do colesterol para o interior da membrana interna da mitocôndria pela proteína reguladora aguda estrogénica, mais vulgarmente conhecida como StAR ou STARD1 (11). A primeira etapa da esteroidogénese envolve conversão do colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) em pregnenolona, cuja reação é catalisada pelo complexo citocromo P450 (CYP450), nomeadamente pela CYP11A1 (6,11).

Posteriormente, a pregnenolona pode seguir duas vias distintas: na primeira é convertida em progesterona pela 3β -hidroxiesteroide desidrogenase (3β -HSD), na segunda converte-se em dihidroepiandrosterona (DHEA) e seguidamente em androstenediona, sendo estas duas últimas reações catalisadas pelas enzimas 17α -hidroxilase (CYP17A1) e 3β -HSD, respetivamente. Pela primeira via de conversão descrita, a síntese de estrogénios continua com a conversão da progesterona em androstenediona pela ação da CYP17A1 (6,11). A androstenediona é um androgénio intermediário nesta via metabólica que permite a síntese de testosterona pela 17β -hidroxiesteroide desidrogenase (17β -HSD) ou da estrona através da sua aromatização. Nas células da granulosa, a expressão da aromatase e da 17β -HSD é controlada pela FSH (6). A CYP19A1, mais conhecida como aromatase, catalisa os passos limitantes da biossíntese de estrogénios (Figura 2). Está envolvida na conversão catalítica de androstenediona em estrona, de testosterona em estradiol e de 16β -hidroxiandrostenediona (obtida pela via DHEA) em estriol (6).

O estetrol é sintetizado exclusivamente durante a gravidez pelo fígado fetal e atinge a circulação materna através da placenta (6). O estriol pode ser sintetizado tanto em mulheres grávidas pela via DHEA, como em mulheres não grávidas através da hidroxilação hepática do estradiol ou da estrona. O E1 pode ainda converter-se reversivelmente em estradiol através da enzima 17β -HSD nos tecidos periféricos (Figura 2) (6).

De todas as formas estrogénicas, o E2, também designado por 17β -estradiol, é o principal produto da via metabólica. É o estrogénio mais potente e predomina durante pré-menopausa (6,12). O E1 é produzido particularmente no tecido adiposo da mama e em outros tecidos periféricos após a menopausa, período durante o qual atinge o seu nível

máximo (6,12). O E₃ é o composto estrogénico menos potente, atingindo grandes quantidades na placenta durante a gravidez (12).

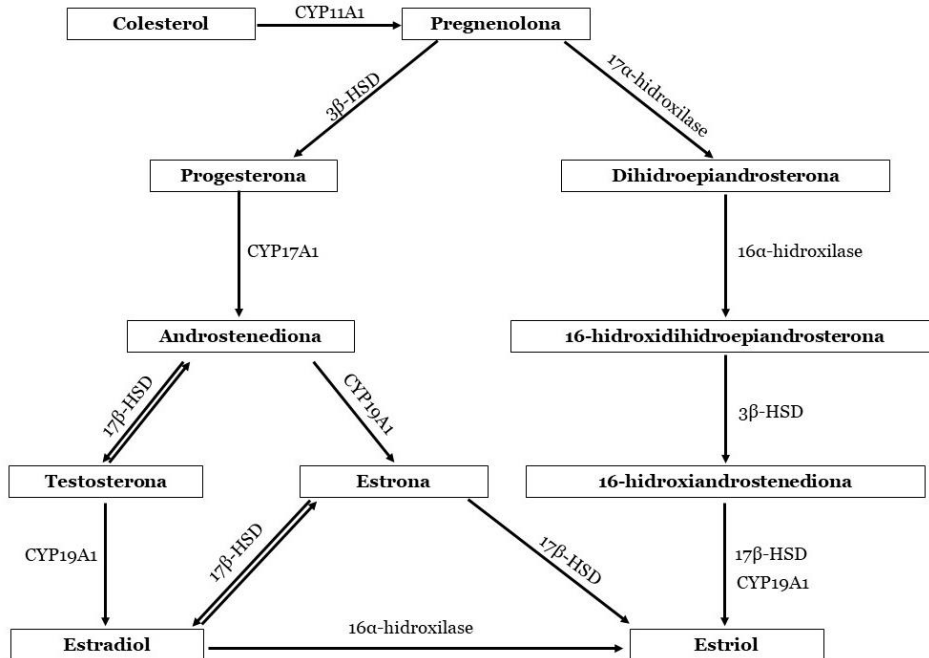


Figura 2. Biossíntese dos estrogénios. 3β-HSD - 3β-hidroxiesteroide desidrogenase, 17β-HSD - 17β-hidroxiesteroide desidrogenase, CYP11A1- Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol, CYP17A1- 17α-hidroxilase, CYP19A1- Aromatase.

1.2.2. Metabolismo dos estrogénios

As moléculas da biossíntese do estrogénio podem ser excretadas pela via urinária ou fecal, para tal, são convertidas em metabolitos estrogénicos inativos. Na fase I do metabolismo os estrogénios são hidroxilados em dois catecóis (2-hidroxiestrogénio e 4-hidroxiestrogénio) sendo a reação catalisada por três enzimas CYP1A1, CYP1B1 e CYP1A2. Devido à elevada expressão destas enzimas no fígado, grande parte do metabolismo dos estrogénios ocorre neste órgão (6,11).

Os catecóis podem, ainda, ser hidroxilados em semi-quinonas e quinonas através de uma via alternativa formando estrogénio-2,3-quinonas e estrogénio-3,4-quinonas. O estradiol-3,4-quinona é um metabolito ativo produzido pela oxidação do 4-hidroxiestradiol (4-OHE₂) com capacidades de auto-oxidação e produção de radicais livres, que podem danificar o material genético (8,13).

Na fase II do metabolismo de estrogénios, os catecóis são metilados pela enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) em metoxiestrogénios, sendo esta a principal via de

destoxificação. No entanto, as hormonas podem ainda ser conjugadas por sulfotransferases (sulfatação) ou por glucoroniltransferases (glucoronidação). Através destas duas últimas reações, os estrogénios são convertidos em compostos inativos, polares e solúveis em água o que facilita a sua excreção (5,11).

1.2.3. Recetores de estrogénios

Os recetores de estrogénio (ER) encontram-se distribuídos por diversos tecidos e órgãos sendo ativados pela ligação de estrogénio. Dividem-se em dois grupos: os recetores nucleares, como o ER- α e o ER- β e os recetores de membrana, como o recetor de estrogénio acoplado à proteína G (GPER1 ou Gpr30) (6,12).

Os recetores nucleares, ER- α e o ER- β , atuam como fatores de transcrição ativados pelo ligando na regulação da expressão de diversos genes-alvo. Este subgrupo de recetores hormonais partilha uma estrutura geral com múltiplos domínios, em que cada domínio direciona as interações necessárias para a resposta hormonal (6,12). O substrato endógeno, 17 β -estradiol, apresenta afinidades semelhantes para ambos os recetores (14).

Um número significativo de casos de cancro de mama hormono-dependentes (aproximadamente 70%) são classificados como cancro de mama ER positivo. Isto significa que, nestes casos se verifica uma sobreexpressão de recetores de estrogénio, principalmente do ER- α (5).

O recetor clássico ER- α é constituído por 595 aminoácidos e é codificado pelo gene ESR1, que se localiza no cromossoma 6. Este recetor está presente na glândula mamária, útero, ovários (células da teca), hipófise, ossos, próstata, fígado, tecido adiposo, entre outros (12,15). Ao contrário do que acontece no tecido tumoral, este recetor tem uma baixa expressão na glândula mamária normal (16). Alguns estudos reportam que o ER- α está associado à sobrevivência celular, proliferação e crescimento de tumores. Desregulações neste recetor estão associados ao desenvolvimento do cancro da mama (12,16).

Por sua vez, o ER- β , é codificado pelo gene ESR2, que se localiza no cromossoma 14, e é constituído por 530 aminoácidos. A sua expressão predomina nos ovário, na próstata, nos pulmões, no tecido adiposo, no cólon e na bexiga (12,15). A sua expressão é diminuída ou praticamente inexistente nos estadios iniciais do cancro da mama (12,17). O papel deste recetor ainda não está bem estabelecido, no entanto, já foi demonstrado que atua como um antagonista do ER- α neutralizando a hiperproliferação descontrolada promovida pelo mesmo. Desta forma, o ER- β demonstra algumas propriedades anti-proliferativas e pró-apoptóticas em células cancerígenas (12,17,18).

Por fim, o gene que codifica o recetor de membrana GPER1, cujo peso molecular é de 44kDa, está localizado no cromossoma 7. Em termos estruturais, a proteína não partilha semelhanças com os recetores nucleares e possui menor afinidade para ligação ao 17 β -estradiol quando comparado com o ER- α e ER- β . Como a ação deste recetor é fundamentalmente não-genómica, as respostas desenvolvidas são relativamente rápidas e incluem a ativação de cascatas de sinalização intracelulares mediadas por segundos mensageiros (6).

1.2.3.1. Estrutura dos recetores ER- α e o ER- β

Todos os membros desta superfamília exibem uma organização funcional e estrutural semelhante, composta por diversos domínios: um domínio amino-terminal (NTD, domínio A / B) que contém a Função de Ativação autónoma 1 (AF-1), um domínio de ligação ao DNA (ácido desoxirribonucleico) (DBD; domínio C) essencial para dimerização do recetor e para a ligação a sequências específicas de DNA, denominadas elementos de resposta a estrogénios (ERE), uma região de dobradiça flexível (domínio D) que conecta o domínio C com o E e contém o sinal de localização nuclear permitindo que os complexos recetor-ligando se desloquem para o núcleo, um domínio carboxi-terminal (LBD, domínio E/F) cuja função é modular a transcrição génica ao nível do ligando e do promotor (Figura 3) (6,12,19). É neste último domínio que constam a Função de Ativação 2 (AF-2) e o local de ligação ao estrogénio.

O AF-1 é importante para a ativação da transcrição independente do ligando, enquanto que o AF-2 é fundamental para a ativação da transcrição dependente do ligando (15).

A principal diferença entre os dois recetores nucleares reside no tamanho do domínio amino-terminal, sendo o do ER- β mais curto do que o do ER- α . Por outro lado, os domínios com maior homologia entre as duas formas são o domínio C, seguido do E/F (15,19).

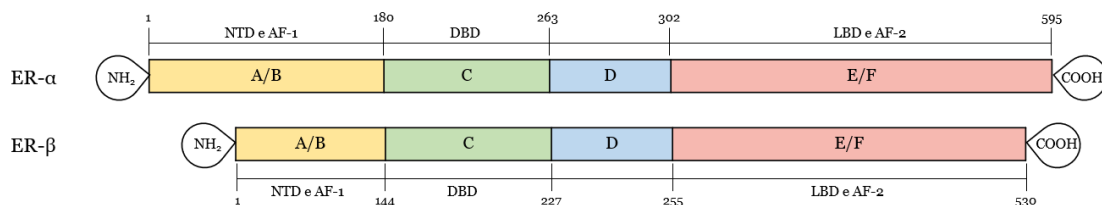


Figura 3. Representação esquemática dos diferentes domínios dos recetores de estrogénio nucleares alfa e beta. AF-1 - Função de ativação 1, AF-2 - Função de ativação 2, DBD - Domínio de Ligação ao DNA (C), LDB - Domínio de Ligação ao Ligando (domínio carboxi-terminal, E/F), NTD - Domínio amino-terminal (A/B), Adaptação de Fuentes (6).

1.2.4. Mecanismos moleculares de ação dos estrogénios

A resposta biológica induzida pelo estrogénio depende de múltiplos fatores, nomeadamente de fatores de transcrição, da presença ou ausência de EREs nas regiões promotoras de genes, de co-reguladores, de estímulos, assim como, da localização e níveis de expressão de ER.

Os eventos de sinalização celular de estrogénios podem ser classificados em eventos genómicos quando o complexo recetor-estrogénio migra para o núcleo e interagem diretamente com os ERE no DNA, ou não-genómicos quando a expressão génica é regulada indiretamente por ativação de cascatas de sinalização intracelular. A sinalização genómica pode ainda ser classificada em direta ou indireta (20).

Na via de sinalização genómica direta, ou via clássica, a ligação de estrogénio a ER- α ou ER- β no citoplasma das células alvo, promove a sua dimerização e induz uma alteração conformacional que permite a internalização do dímero para o núcleo. No interior do núcleo, o complexo liga-se aos EREs localizados nos promotores de genes alvo, recrutando diversos co-reguladores para promover a expressão génica (Figura 4) (6,20).

Por outro lado, aquando da inexistência de sequências de EREs nos genes regulados pelos ER, a sinalização denomina-se genómica indireta (Figura 4). Em vez da ligação direta recetor-ligando, estabelecem-se ligações proteína-proteína entre o dímero e outros fatores de transcrição como a proteína ativadora (AP-1) e a proteína de especificidade (SP-1), sendo possível promover a ativação ou repressão dos genes alvo (6,18,20).

A sinalização não genómica resulta de uma ação estrogénica rápida na membrana celular, que envolve a ativação de várias cascatas de proteínas cinases com consequente fosforilação de fatores de transcrição (Figura 4). Tanto o recetor de membrana GPER1 como algumas isoformas do ER- α e ER- β estão associados à sinalização não genómica (6). O estrogénio ao ligar-se ao GPER1 pode promover a mobilização de cálcio intracelular, ativação da adenilato ciclase, produção de adenosina monofosfato cíclica (cAMP), ativação cascata de sinalização da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK), da proteína cinase C (PKC) ou da cascata de fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K) (6,18,20). Contudo, na ausência de estrogénio os recetores também podem ser fosforilados e, consequentemente, ativados por fatores de crescimento, por exemplo o fator de crescimento epidérmico (EGF), e pela ativação de diversas cascatas de sinalização comuns à sinalização não genómica (Figura 4) (20).

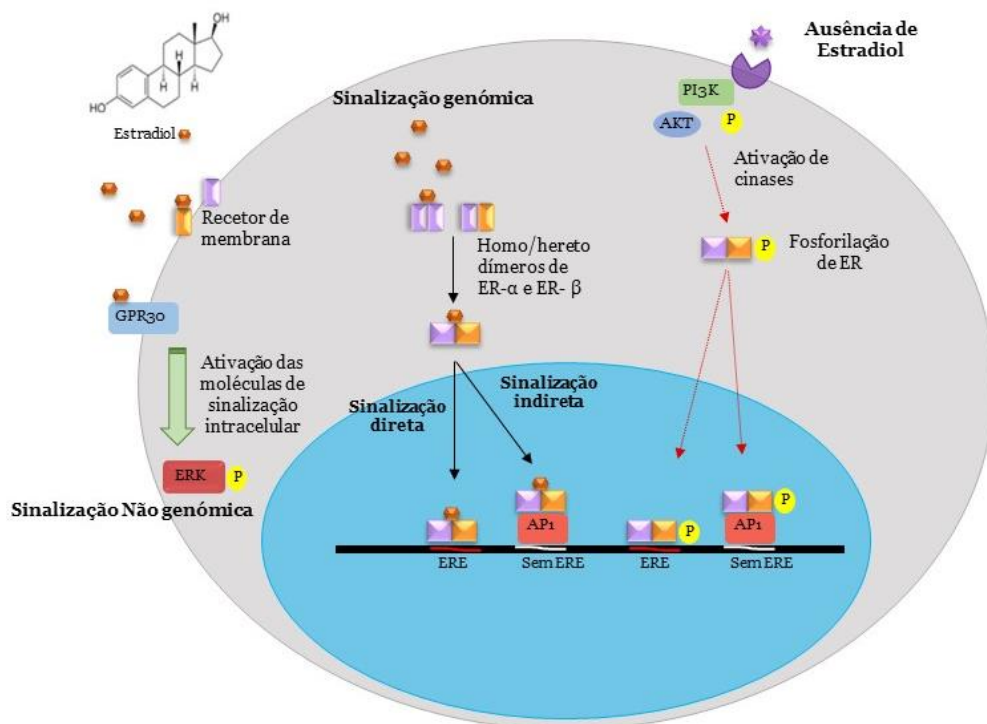


Figura 4. Vias de sinalização dos estrogénios. Adaptado de Khan (21). AKT- Proteína cinase B, AP-1 – Proteína ativadora 1, ER- Recetor de estrogénio, ERE- Elementos de Resposta ao Estrogénio, ERK- Cinase regulada por sinal extracelular, GPR30- Recetor acoplado à proteína G, PI3K-fosfatidilinositol-3-cinase, P- fosforilação.

1.2.5. O Papel dos estrogénios no cancro

Os estrogénios estão intimamente ligados com o risco de desenvolvimento de cancro da mama. Destacam-se, pelo menos, três mecanismos pelos quais estes compostos podem induzir lesões no DNA das células e, conseqüentemente, levar à formação de tumores: taxa de metabolismo dos estrogénios e atividade mitocondrial, ambos associados à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), e efeitos a nível da reparação do DNA (Figura 5) (8,13).

Quando as células epiteliais da mama são expostas a níveis estrogénicos elevados, como no caso da utilização da terapia hormonal de substituição para a diminuição de sintomatologias associadas à menopausa, as células podem acumular erros de replicação. Estes erros surgem em consequência da estimulação proliferativa, conduzindo a diferentes mutações no DNA e ao desenvolvimento de cancro (8,13,17).

Existem estudos que demonstram o papel dos estrogénios como disruptores dos mecanismos de resposta a lesões no DNA, bem como dos mecanismos de reparação (8,22). Estes mecanismos são essenciais para preservar a integridade do genoma e impedir a transmissão destas alterações para as células-filha. Quando estes mecanismos falham, é induzida a apoptose a essas células. Se tal não acontecer, as mutações são perpetuadas e conduzem à progressão do cancro (22,23).

Por outro lado, uma vez que os estrogénios induzem a proliferação celular, é necessário que as mitocôndrias acompanhem as necessidades energéticas da célula (8,13). Desta forma, com o incremento da proliferação verifica-se uma atividade mitocondrial aumentada (8). Sob stress, este processo contribui para a formação ROS, que danificam todas as estruturas celulares, incluindo os ácidos nucleicos (8,22).

As ROS também podem ser produzidas durante o metabolismo celular dos compostos estrogénicos. Após a hidroxilação dos estrogénios em catecóis, estes últimos podem sofrer uma oxidação originando semi-quinonas e quinonas que apresentam características mutagénicas e interagem diretamente com o DNA para formar aductos (forma de lesão no DNA) (13,23).

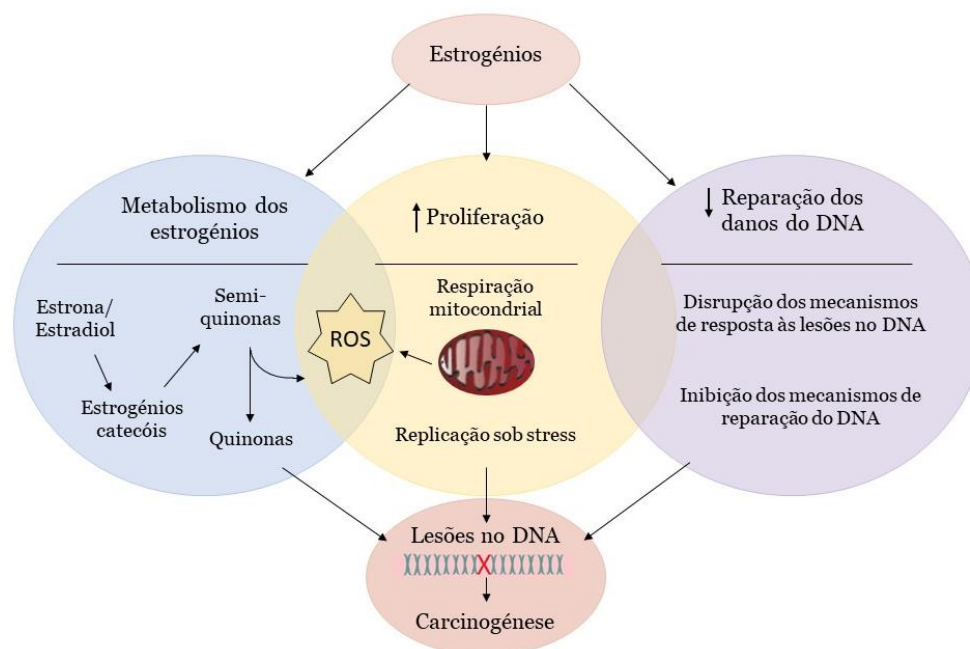


Figura 5. Papel dos estrogénios na carcinogénese. ↑ - Aumento, ↓ - Diminuição, DNA- Ácido desoxirribonucleico, ROS- Espécies reativas de oxigénio. Adaptado Bhardwaja (8).

1.3. Aromatase

A enzima aromatase pertence à superfamília do citocromo P450, é codificada pelo gene CYP19A1 que se localiza no cromossoma 15q21.2. A aromatase encontra-se no retículo endoplasmático de células produtoras de estrogénio e é regulada por promotores específicos de cada tecido, podendo ocorrer uma indução de produção local ou sistémica de estrogénios, quer em condições fisiológicas ou patológicas (24). É responsável pelos passos limitantes da conversão dos androgénios em estrogénios nomeadamente em 17β-estradiol e estrona.

Para tal, a enzima forma um complexo de transferência de eletrões com a NADPH-citocromo P450 redutase (CPR) (25,26). Durante a aromatização, os eletrões são transferidos do NADPH, através de dois co-fatores: dinucleótido de flavina e adenina (FAD) e mononucleótido de flavina (FMN), para o heme da aromatase e posteriormente para o substrato androgénico (25,26). Esta reação ocorre na presença de oxigénio e o grupo heme é reduzido através da conversão do heme férrico (Fe^{3+}) em ferro ferroso (Fe^{2+}) (26).

São oito os promotores que regulam a expressão do gene CYP19A1: I.1 e I.2a na placenta, I.3 no tecido adiposo, I.4 na pele, tecido adiposo e osso, I.6 no osso, I.7 nas células endoteliais, I.f no cérebro e II nas gónadas e tecido adiposo (8,27). Destes salienta-se o papel ativo dos promotores I.3, I.4 e I.7 e II na expressão da aromatase nas células mamárias cancerígenas, o que conduz a um aumento da transcrição do gene e uma consequente sobreexpressão da enzima neste tipo de tecido, comparativamente ao tecido mamário normal, que usa quase exclusivamente o promotor I.4 (7,8,27). Estes promotores são estimulados pela prostaglandina PGE2 (I.3 e II), glucocorticoides, citocinas como as Interleucinas 6 e 11 e TNF- α (fator de necrose tumoral) (I.4) e o fator de transcrição GATA2 (I.7) (7,8). Apesar da regulação da enzima ser conduzida por promotores diferentes, a proteína traduzida é idêntica em todos os tecidos (8,11).

A aromatase está associada a efeitos biológicos fundamentais em diferentes estádios do desenvolvimento. Se por um lado a sua expressão ovárica e mamária é necessária para o desenvolvimento das características sexuais na puberdade, na adolescência tem um papel relevante na maturação óssea além de mediar o crescimento uterino. Na idade adulta torna-se essencial para o metabolismo lipídico e para regulação do risco cardiovascular (24).

A regulação da expressão desta enzima contribui de forma direta para moderar a biossíntese de estrogénios e indiretamente para regular a expressão de diversos fatores de crescimento responsáveis pela carcinogénese. Desta forma, entende-se que a inibição da atividade da enzima aromatase seja uma das linhas de tratamento do cancro de mama dependente de estrogénios (28).

1.3.1. Terapia do Cancro da mama - Inibidores da Aromatase

A hormonoterapia é uma das estratégias mais utilizadas como terapêutica para o cancro de mama recetor estrogénio positivo (ER +). Uma das primeiras linhas de tratamento deste tipo de cancro centra-se na prescrição de tamoxifeno (TAM), um modelador seletivo dos recetores de estrogénio (SERM) (8,29). No entanto, muitas mulheres com cancro de mama tornam-se resistentes ao TAM e, conseqüentemente, este atua como um agonista parcial dos ER, induzindo efeitos estrogénicos (8,27).

Foi neste contexto que surgiram os inibidores da aromatase (IA). Esta terapêutica envolve a inibição da biossíntese dos estrogénios, com conseqüente diminuição da concentração fisiológica dos mesmos (27,30). Os inibidores da aromatase subdividem-se em duas grandes categorias: os inibidores esteroides como o exemestano, que apresenta uma estrutura semelhante aos androgénios, e os inibidores não esteroides de segunda geração como o fadrozol e de terceira geração como o anastrozol e o letrozol (Figura 6) (27,30). Estes últimos são altamente potentes e específicos para a enzima, além de possuírem baixa toxicidade. Na sua estrutura, o letrozol apresenta um anel triazol, que se liga de forma reversível ao grupo heme da aromatase, inibindo as reações de hidroxilação da esteroidogénese catalisadas pela CYP19A1 (27). Em oposição, estudos mais recentes demonstraram, através de simulações computacionais, que o letrozol atua como inibidor não competitivo ligando-se a um canal específico junto ao sítio ativo da aromatase (31).

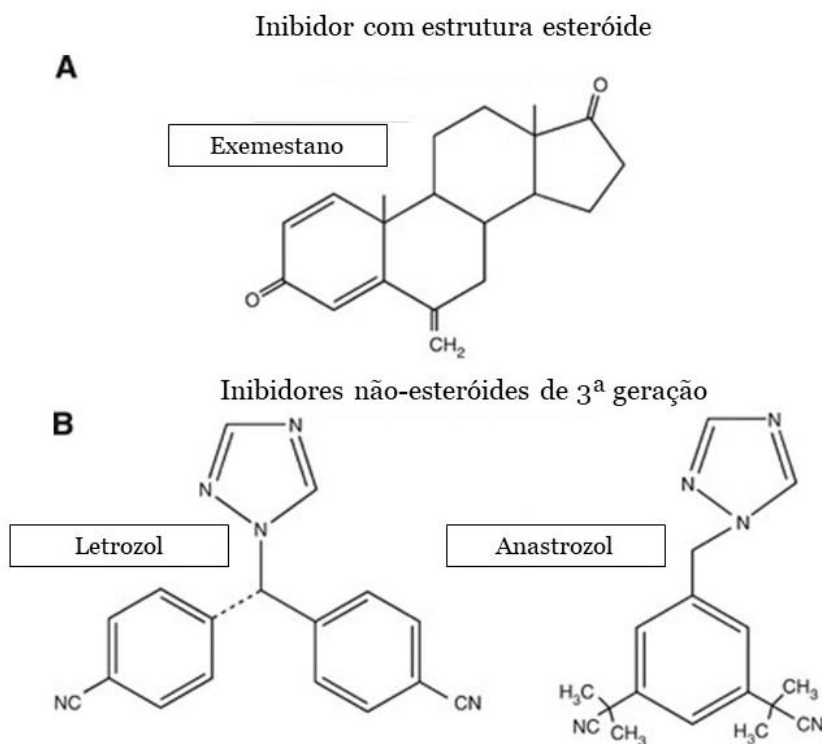


Figura 6. Estrutura química dos inibidores da aromatase: Exemestano, Letrozol e Anastrozol. Adaptado de Geisler (32).

Os inibidores seletivos da aromatase também são recomendados como terapêutica para mulheres com cancro da mama em pós-menopausa (8,29). Quanto às mulheres em pré-menopausa, a síntese de estrogénios ocorre essencialmente nos ovários sendo regulada pela hormona hipofisária FSH. Nestes casos, a administração isolada de IA provoca uma diminuição na síntese de estrogénios o que potencia um mecanismo de compensação no

eixo hipotálamo-hipófise, com produção aumentada de GnRH (Hormona libertadora de gonadotrofinas), FSH e LH (Figura 7) (8,29). Para contrariar esse *feedback* é necessário suprimir a função ovárica através do uso de análogos agonistas da GnRH, ou recorrendo à ooforectomia para ablação ovárica (29,33).

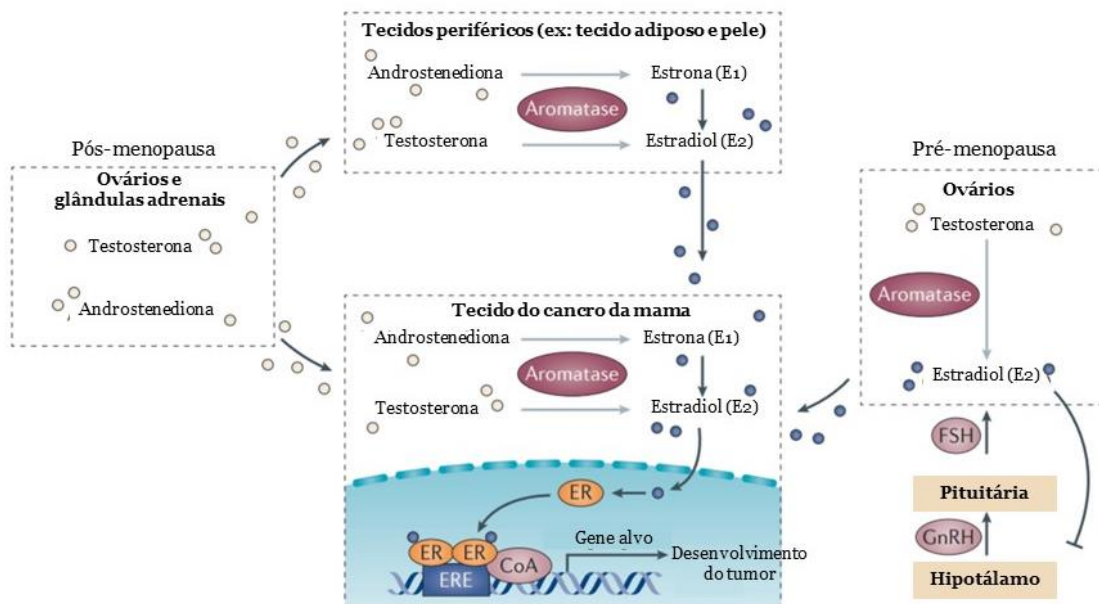


Figura 7. Síntese de estrogénios na pré- e pós-menopausa e mecanismo de ação dos inibidores da aromatase. FSH – Hormona Foliculo Estimulante, GnRH- Hormona libertadora de gonadotrofinas. Adaptado de Ma (33).

Vários estudos referem que os IA são mais eficazes a diminuir a recorrência de cancro da mama durante o tratamento (cerca de um terço a menos de recorrências) e a mortalidade associada (na primeira década) quando comparados com a administração isolada de TAM (35–37). A extensão da terapia endócrina adjuvante (com TAM ou IA), além dos 5 anos, pode reduzir de forma mais eficaz a recorrência de cancro (35). No entanto, esta extensão no tratamento pode provocar efeitos adversos consideráveis nas mulheres, como sintomas da menopausa e osteoporose, cancro endometrial e doenças tromboembólicas (8,29,35).

1.4. Soja

A *Glycine max*, também conhecida como soja, é uma leguminosa que pertence à família *Leguminosae* e à subfamília *Papilionideae*. É oriunda de países asiáticos e começou a ser incorporada na alimentação ocidental desde o século XVIII (38).

A soja é constituída por uma grande diversidade de nutrientes como proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas e minerais como cálcio, magnésio, potássio, ferro e zinco (38). Além disso, não contém colesterol nem lactose (39). No entanto, a composição da soja

varia de acordo com a espécie, localização do cultivo, clima, com as práticas agrícolas e de processamento (39,40).

As sementes desta planta são muito utilizadas para a produção de diversos produtos alimentares, como bebidas vegetais, óleo, molhos e farinha de soja, mas também para produtos industriais e farmacêuticos, como os suplementos alimentares (39,41,42).

O foco do consumidor em produtos à base de soja aumentou significativamente nos últimos anos, principalmente desde o estudo da *Women's Health Initiative* (WHI), no qual mulheres tratadas com estrogénio e progesterona apresentaram riscos mais elevados de desenvolver cancro da mama, problemas cardíacos e embolia pulmonar, comparativamente às tratadas com placebo (43). Como consequência, muitas mulheres abandonaram a terapêutica hormonal combinada e recorreram aos suplementos naturais à base de plantas, por assumirem que estes se apresentavam como seguros, eficazes e desprovidos de efeitos adversos (43). No entanto, apesar de serem substâncias naturais obtidas a partir de plantas muitos destes suplementos são preparados a partir de plantas inteiras ou partes destas e, por isso, são o resultado de uma mistura de diversas substâncias que podem provocar efeitos indesejáveis e/ou interações medicamentosas (44). Outro fator que contribuiu para potenciar o consumo de soja, baseou-se nas diferenças alimentares entre mulheres asiáticas e ocidentais, sobretudo devido à associação estabelecida entre um elevado consumo de soja e a relação inversa com o risco de desenvolvimento de cancro da mama em mulheres asiáticas (39).

Um dos aspetos mais característico da soja é o alto teor em isoflavonas (ronda os 1,2-4,2mg/g de peso seco), nomeadamente genisteína, daidzeína e gliciteína representando aproximadamente 50%, 40% e 10%, respetivamente, do conteúdo total de isoflavonas na soja (45,46). Ainda assim, os produtos à base de soja altamente processados podem perder até 80% do seu conteúdo em fitoestrogénios, isto é, os componentes bioativos da soja (40).

1.4.1. Fitoestrogénios

Os fitoestrogénios são compostos naturais derivados de plantas, encontrados numa ampla variedade de leguminosas, frutas, vegetais e cereais como soja, alfafa, sementes de linho, trevo vermelho e alcaçuz (47-49). Estas moléculas apresentam semelhanças estruturais e funcionais com os estrogénios, em particular com o 17β -estradiol. A semelhança no tamanho e a presença de um grupo hidroxilo fenólico que mimetiza o grupo hidroxilo do 17β -estradiol, permite-lhes interagir com os domínios de ligação ao ligando dos recetores hormonais, desencadear respostas estrogénicas ou antiestrogénicas, interferir com a transcrição do DNA e, conseqüentemente, com a expressão de alguns genes (47,50).

Portanto, os fitoestrogénios podem afetar os processos regulados pelos estrogénios incluindo a atividade da aromatase (49).

Quanto à sua estrutura química, estes compostos polifenólicos podem-se classificar em flavonoides dentro dos quais se destacam os prenilflavonoides como a 8-prenilnarigenina, isoflavonas como a genisteína e daidzeína, lignanos como enterolactona, coumestanos como coumestrol, e estilbenos como resveratrol (Figura 8) (48,49,51).

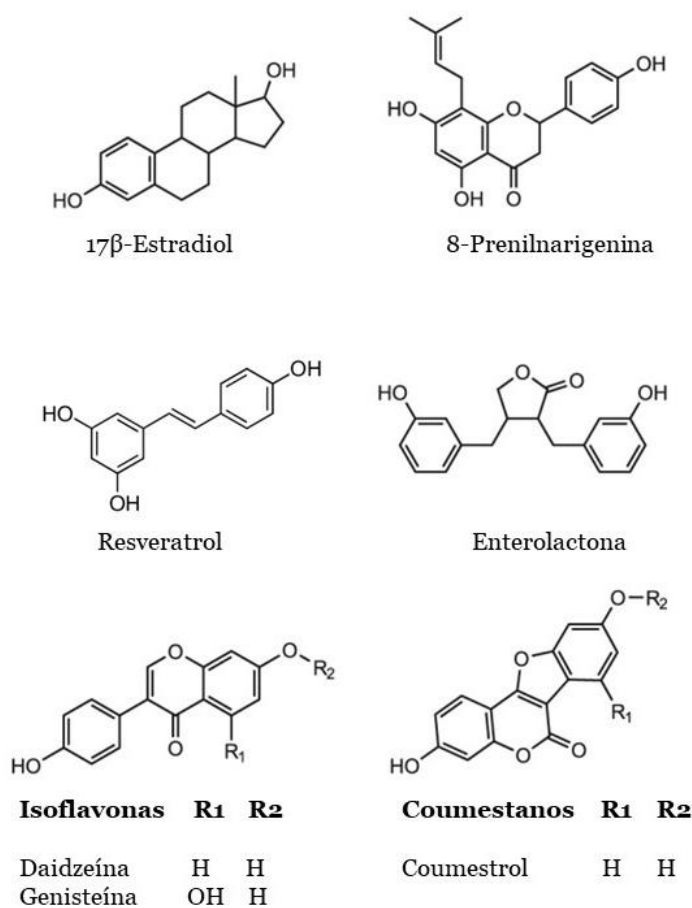


Figura 8. Estruturas químicas de diversos fitoestrogénios. Adaptado de Rietjens e Alexander V. Sirotkin (49,50).

Os fitoestrogénios, apesar de serem capazes de se ligar aos recetores de estrogénio, a sua afinidade de ligação a estes é inferior à do estrogénio endógeno, e por isso, a sua potência estrogénica/anti-estrogénica também é menor (46,47). Além disso, a sua atividade biológica também pode ser influenciada pelo nível de estrogénios endógenos, presença ou ausência de recetores de estrogénio, bem como pela dose de fitoestrogénios (48). Contrariamente ao 17β-estradiol, apresentam uma maior afinidade pelo ER-β do que pelo ER-α (47,52). Os fitoestrogénios podem comportar-se como antagonistas, quando estão presentes em elevadas concentrações, bloqueando os efeitos do estrogénio endógeno. Em contrapartida, num ambiente com reduzidos níveis de estrogénio, comparáveis aos níveis pós-menopausa,

os fitoestrogénios agem como estrogénios fracos. No entanto, a baixa afinidade pelos ER pode ser compensada pela exposição a altas doses de fitoestrogénios (46).

Foi demonstrado que diversas moléculas deste grupo de compostos vegetais atuam como moduladores seletivos do recetor de estrogénio, tornando-os agentes potencialmente atraentes para a redução do risco de sintomas da menopausa como afrontamentos e osteoporose, redução de doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes tipo II e da incidência de diversos cancros como o da mama e da próstata (47,51,53).

Sabe-se que o tipo de alimentação é um fator que contribui para potencializar o risco de desenvolvimento de tumores hormono-dependentes. A ingestão de fitoestrogénios em países ocidentais é muito inferior do que em países asiáticos, principalmente devido à dieta asiática ser rica em soja. Estima-se que a ingestão típica de fitoestrogénios na Ásia varie entre 20 a 100 mg por dia, enquanto o consumo diário na Europa é inferior a 3 mg, embora este valor possa ser superior para mulheres em menopausa que tomem preparações à base de soja como alternativa à THS (11,50). No entanto, sabe-se que existem outros fatores, como as diferenças genéticas entre as populações, que podem contribuir para reduzir a incidência de cancro da mama, e portanto, a dieta alimentar não deve ser um parâmetro analisado de forma isolada (54). Apesar de existirem vários estudos que estudem os efeitos dos fitoestrogénios na saúde da mulher, os resultados obtidos pelos mesmos permanecem controversos (47,53).

No grupo dos fitoestrogénios, as isoflavonas da soja suscitaram desde cedo curiosidade por parte dos investigadores para compreender melhor o papel fisiológico destes compostos bioativos.

1.4.2. Isoflavonas da Soja

Dentro da classe das isoflavonas da soja, a genisteína (7,4'-dihidroxi-6-metoxiisoflavona) e a daidzeína (7,4'-dihidroxiisoflavona) são as mais predominantes. Encontram-se, principalmente, sob duas formas: glicosídeos (formas inativas, altamente polares e pouco absorvidos) e agliconas (formas biologicamente ativas). Na alimentação estes compostos encontram-se essencialmente como conjugados glicosídeos. Após a ingestão, os glicosídeos são hidrolisados por enzimas gastrointestinais como as β -glucosidases dando origem às agliconas. Estas moléculas são lipossolúveis e absorvidas pela mucosa intestinal (Figura 9). As agliconas podem ainda ser metabolizadas pelas bactérias da flora intestinal produzindo metabolitos secundários com maiores semelhanças com os estrogénios e, portanto, com maior afinidade para os ER, como o equol, o metabolito mais ativo da daidzeína (48,55). Como resultado do metabolismo, a genisteína é convertida em dihidrogenisteína (DHG) e em 6'-hidroxi-O-desmetilangolensina (6-OH-O-DMA) e a daidzeína é reduzida a

dihidrodaidzeína (DHD) e, posteriormente, em equol ou O-desmetilangolensina (O-DMA) (56). Após a sua absorção, são conjugadas com o ácido glucorónico e com o ácido sulfúrico. Estes produtos conjugados circulam livremente na corrente sanguínea e exercem a sua atividade biológica até serem excretados através da urina ou das fezes (48).

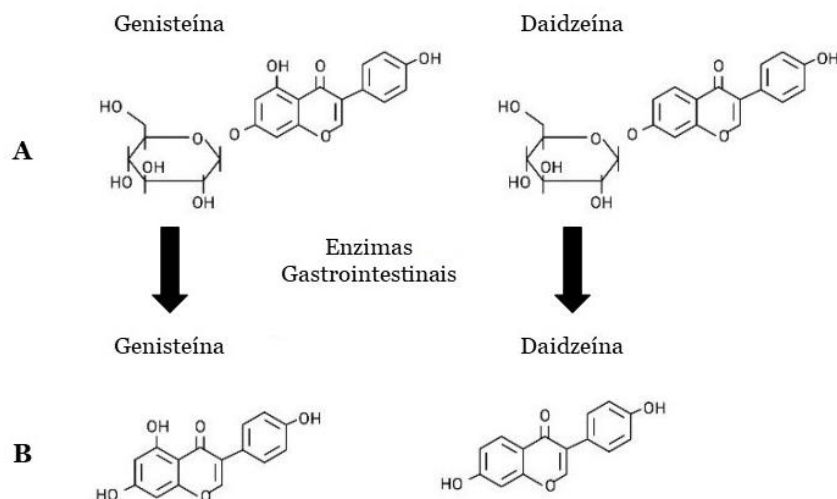


Figura 9. Conversão das formas glicosídicas da genisteína e daidzeína (A) em agliconas (B). Adaptado de Chen (55).

As isoflavonas medeiam os seus efeitos biológicos através da modulação das vias de sinalização dos estrogénios. Podem atuar através da sinalização genómica ligando-se aos recetores nucleares alfa e beta, conduzindo à expressão génica e síntese proteica, ou através da sinalização não genómica que inclui a ligação ao GPER1 e a ativação ou repressão de outras vias de sinalização. A atividade destes compostos naturais é mediada essencialmente pela sua maior afinidade para o ER- β (57). A genisteína apresenta uma afinidade de ligação para este recetor 20 a 30 vezes maior do que para ER- α , enquanto que a daidzeína tem afinidade apenas 5 vezes maior para ER- β (46). Contudo, as ações exercidas pelas isoflavonas no cancro da mama demonstram ser dependentes da dose. Em baixas concentrações (inferiores a 1 μ M) estimulam o crescimento celular e inibem a apoptose contrariamente ao que se verifica em concentrações mais elevadas (superiores a 1 μ M) (57,58).

Estas substâncias desempenham um papel importante na saúde humana, mas a sua eficácia clínica depende muito das suas propriedades farmacocinéticas. Em particular, a absorção, concentração plasmática e excreção urinária das isoflavonas dependem da dose administrada, bem como da biodisponibilidade relativa que, por sua vez, é influenciada pelo tempo do trânsito intestinal e pela flora intestinal (48,55).

As isoflavonas têm demonstrado atividade quimioprotetora e podem ser usadas como terapia alternativa para diversos distúrbios hormonais. Vários estudos mostraram que tanto

a genisteína como a daidzeína podem inibir o ciclo celular, o crescimento de diferentes linhas celulares cancerígenas, afetar a expressão de genes apoptóticos, interferir no estado redox das células e modelar a ação de algumas enzimas do citocromo P450, nomeadamente a CYP19A1 (57–60).

O consumo de isoflavonas continua a ser um tema controverso, com alguns autores a apresentarem resultados desfavoráveis à sua ingestão. Alguns estudos mostraram que a genisteína e a daidzeína atuam como disruptores endócrinos, estimulam o crescimento de células da linha de cancro da mama MCF-7, podendo aumentar o risco de recidiva ou estimular o crescimento de tumores pré-existentes (60,61). Segundo Wei e colaboradores, a genisteína pode aumentar os níveis celular de ROS (62). Além disso, foi sugerido que os suplementos à base de soja podem afetar a eficácia das terapêuticas do cancro da mama com inibidores da aromatase (ex: letrozol e fadrozol) e modeladores seletivos do recetor de estrogénio (ex: tamoxifeno) (60,61,63).

2. Objetivos

Este trabalho tem como principais objetivos:

- Estudar os efeitos do 17β -estradiol e do extrato de soja na adesão de células do cancro da mama;
- Estudar os efeitos do 17β -estradiol e dos extratos de soja na atividade específica da aromatase em células do cancro da mama.

Para alcançar este objetivo foram desenvolvidos vários estudos:

- Efeito do 17β -estradiol e do extrato de soja, em diferentes concentrações, na adesão das células epiteliais MCF-7 à superfície de crescimento;
- Efeito do 17β -estradiol e do extrato de soja na cinética do metabolismo do substrato fluorogénico da aromatase, na presença e ausência do inibidor da aromatase em células da linha MCF-7.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

Os reagentes utilizados foram obtidos em diferentes fornecedores:

- Acetonitrilo, *Carlo Erba Reagents*;
- Antibiótico (constituído por 10,000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B);
- *Aromatase (CYP19A) Activity Assay Kit* na Biovision Incorporated;
- Bicarbonato de sódio (NaHCO₃), *Fisher Scientific*;
- Cloreto de Potássio (KCl), *AppliChem*;
- Cloreto de Sódio (NaCl), *Fisher Scientific*;
- Dimetilsulfóxido (DMSO), *Honeywell Research Chemicals*;
- Fosfato dissódico (NaHPO₄), *Fisher Scientific*;
- Fosfato monopotássico (KH₂PO₄), *Honeywell*;
- Meio de Cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), *Sigma Aldrich*;
- *Pierce™ BCA Assay kit*, *Thermo Fisher Scientific*;
- Soro bovino fetal (FBS), *Biochrom*;
- Tampão Fosfato Salino (PBS).

3.2. Linha celular

- Linha celular de adenocarcinoma, MCF-7 (ATCC® HTB-22™)

3.3. Compostos a testar

- 17β-estradiol, *Sigma Aldrich*;
- Extrato de soja comercial com 175mg de extrato por cápsula.

3.4. Equipamentos e materiais

- Balança analítica, *RadMag PS 2100.R2*;
- Câmara de fluxo laminar vertical, Classe II, *NuAire*;
- Câmara de *Neubauer*;
- Centrifugadora, *Sigma 3K18C, Bioblock Scientific*,
- Incubadora, *NuAire, DHD autoflow*;
- Fluorímetro, *Spectra Max Gemini EM*;
- Leitor espectrofotométrico de microplacas, *Bio-Rad xMark*;
- Microscópio invertido, *Olympus CK40*;

- Potenciómetro medidor de pH, *Thermo Scientific Orion Star A211*;
- Vórtex, *VELT Científica*;
- *Cell scraper*;

3.5. Cultura celular

Neste trabalho prático foi utilizada a linha celular de cancro da mama MCF-7, isolada pela primeira vez pelo *Michigan Cancer Foundation*. Esta linha celular é intensivamente utilizada em diferentes ensaios devido às suas propriedades de crescimento em monocamada, aderência e presença de ER- α (mais abundantes) e de ER- β (menos abundantes) (64).

As células MCF-7 foram ressuspendidas em 30mL de meio de cultura e adicionaram-se 7mL desta suspensão às soluções com os compostos em estudo. Após a preparação das soluções de trabalho (17 β -estradiol 2nM, extrato de soja 0,0875 μ g/ μ L e extrato de soja 0,021875 μ g/ μ L), descritas nos tópicos seguintes, adicionaram-se 2mL diretamente a cada poço das placas *multiwells*.

Para iniciar este trabalho prático foi necessário recorrer a alíquotas de *stock* da linha celular armazenadas em bancos de células a -80°C. Para tal, descongelou-se, à temperatura ambiente, o conteúdo de 30 tubos criogénicos, os quais foram ressuspendidos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% (V/V) FBS e 1% (V/V) de antibiótico/antimicótico. De seguida, a suspensão foi centrifugada a 100RCF durante 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante, e ressuspendeu-se o *pellet* em 30mL de meio de cultura, que foi transferido para os *falcons* com as soluções 17 β -estradiol 2nM, extrato de soja 0,0875 μ g/ μ L e extrato de soja 0,021875 μ g/ μ L.

3.6. Preparação do meio de cultura - DMEM

Para a preparação de 1L de meio DMEM completo dissolveu-se um frasco de meio DMEM liofilizado (13,4g) e 3,74g de NaHCO₃ num litro de água milli-Q. Após o ajuste do pH para pH=7,2 suplementou-se o meio com 10% (V/V) FBS e 1% 10% (V/V) de antibiótico/antimicótico dando origem ao meio completo. Posteriormente, filtrou-se a preparação com auxílio do sistema de vácuo da câmara de fluxo laminar vertical e uma membrana com poros de 0.2 μ m. Por fim, armazenou-se a 4°C.

3.7. Preparação dos compostos a testar

3.7.1. Preparação das soluções de 17β -estradiol

A solução inicial de 17β -estradiol cuja concentração é de 10^{-2} M foi reconstituída através da dissolução de 2,7mg de 17β -estradiol liofilizado em 1mL de DMSO.

A partir desta solução inicial, prepararam-se duas diluições em meio de cultura de modo a serem obtidas as soluções intermédias de concentrações 10^{-3} M e 10^{-5} M, conforme a figura 10.

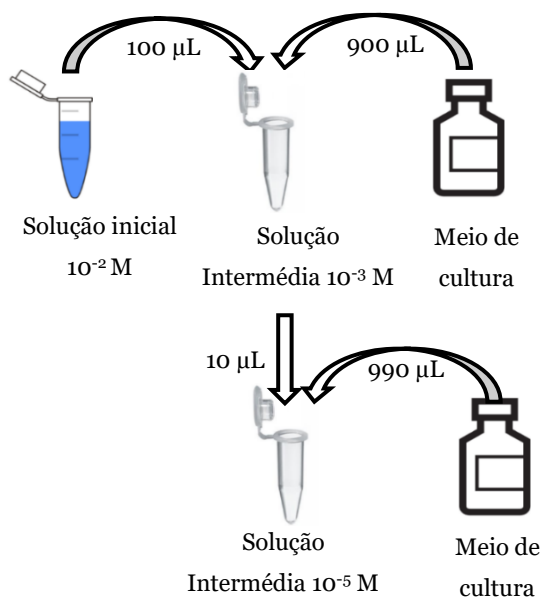


Figura 10. Preparação das soluções intermédias de 17β -estradiol.

A partir da solução intermédia de 10^{-5} M, preparou-se a solução para o trabalho experimental, através da diluição em meio de cultura e com a suspensão celular, de forma a obter a concentração final de 2 nM. A preparação da solução está descrita na figura 11.

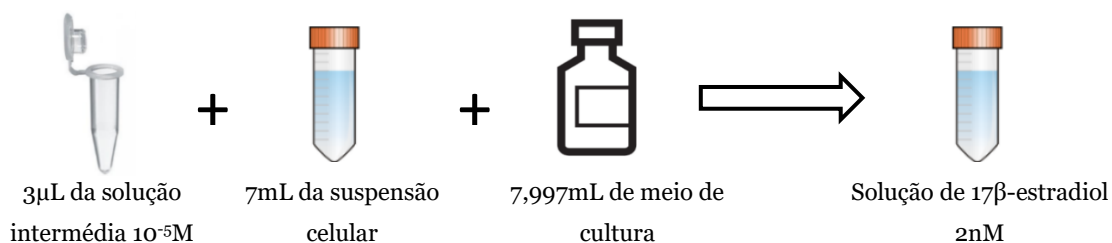


Figura 11. Preparação da solução de 17β -estradiol 2nM.

3.7.2. Preparação das soluções de extrato de soja

O extrato de soja foi obtido através de uma preparação comercial cuja forma farmacêutica se encontra em cápsulas. Cada cápsula contém 175mg de extrato de soja, dos quais 17,5mg são isoflavonas, destes 11mg são agliconas e destes 5,5mg correspondem à daidzeína. O teor em genisteína não se encontrava descrito na caracterização do extrato.

Dissolveram-se os 175mg de extrato de soja em 1 mL de DMSO. Posteriormente, homogeneizou-se no vortéx e filtrou-se a solução num filtro de diâmetro de poro de 22µm.



Figura 12. Preparação da solução inicial de extrato de soja 175µg/µL.

Desta forma, obteve-se a solução inicial, cuja concentração é de 175 µg/µL, sendo o ponto de partida para duas diluições sucessivas de 1:2 e de 1:4 em DMSO. As concentrações das soluções intermédias são 87,5 µg/µL e 21,875 µg/µL, perfazendo um volume total de 1mL com DMSO.

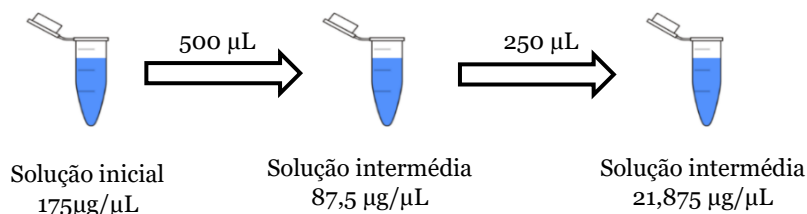


Figura 13. Preparação das soluções intermédias de extrato de soja 87,5 µg/µL e 21,875 µg/µL.

Partindo das soluções intermédias, prepararam-se as soluções para o trabalho experimental através da diluição em meio de cultura e com a suspensão celular, de forma a obter as soluções de concentrações finais 0,0875µg/µL e 0,021875µg/µL de extrato de soja. A preparação das soluções está descrita nas figuras 14 e 15.

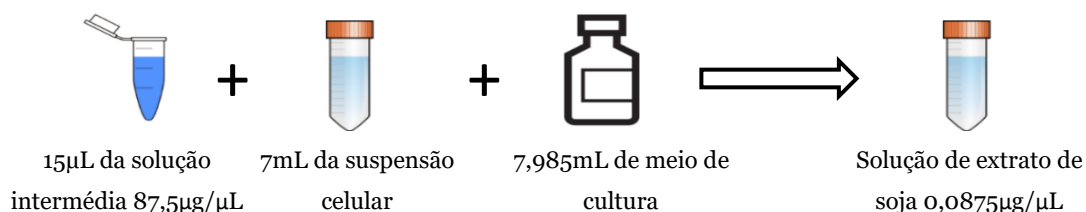


Figura 14. Preparação da solução trabalho de extrato de soja 0,0875µg/µL.

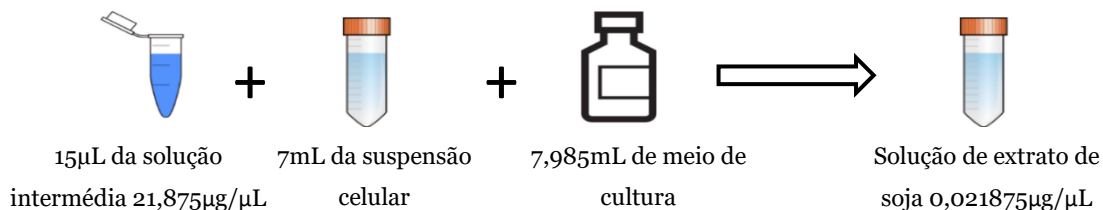


Figura 15. Preparação da solução trabalho de extrato de soja 0,021875µg/µL.

Tabela 1- Concentrações das soluções de extrato de soja preparadas e concentrações em contacto com as células

Concentração das soluções de extrato de soja preparadas	Concentração de extrato de soja em contacto com as células
87,5 µg/µL	0,0875 µg/µL
21,875 µg/µL	0,021875 µg/µL

3.8. Justificação das concentrações a testar

As concentrações supracitadas de 17β-estradiol (2nM) e de extrato de soja (87,5 µg/µL e 21,875 µg/µL), foram selecionadas tendo por base outros trabalhos já desenvolvidos pelo mesmo grupo de investigação, no qual se insere este projeto e, também, por outros investigadores (58,65–68).

3.9. Contagem de células

Para realizar os ensaios, é necessário contabilizar o número de células viáveis. Para tal, da suspensão celular retirou-se 1mL para um *eppendorf*. Deste, retiraram-se 10µL para outro *eppendorf* ao qual se adicionou 10µL de corante azul tripano e se homogeneizou. Recorrendo a uma câmara de *Neubauer*, colocaram-se 10µL da suspensão anterior e contabilizou-se o número de células viáveis por quadrante. Para estimar o número de células por mililitro e o número total de células nos *falcons* recorreu-se às seguintes fórmulas:

$$N^{\circ} \text{ células viáveis/mL} = \text{Média de células viáveis nos 4 quadrantes} \times \text{Fator de diluição} \times 10^4$$

$$N^{\circ} \text{ total de células viáveis} = N^{\circ} \text{ de células viáveis por mL} \times \text{Volume total de resuspensão}$$

3.10. Ensaios realizados para avaliar a adesão celular e a atividade enzimática em culturas de células *in vitro*

3.10.1. Procedimento geral para os dois ensaios

Para a realização dos ensaios descritos ao longo desta secção procedeu-se à preparação de 4 placas *multiwell* de 6 poços (Orange Scientific, 2 placas *multiwell* para cada ensaio) com uma densidade celular de $1,24 \times 10^6$ por poço. Testaram-se, em triplicado, duas concentrações do extrato de soja (87,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e 21,875 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e uma concentração de 17 β -estradiol (2 nM).

As placas (com a suspensão celular e compostos em estudo) foram incubadas durante 48 horas numa incubadora a 37°C numa atmosfera com 95% de humidade e 5% de CO₂. Decorrido este período, deu-se início a cada um dos ensaios.

A fim de avaliar a adesão das células na presença dos compostos em estudo recorreu-se ao ensaio de doseamento de proteínas pelo método do ácido bicinconínico (BCA) através do *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*. Para avaliar a atividade da aromatase na linha celular MCF-7, na presença dos compostos, utilizou-se o *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit*.

3.10.2. Ensaio de doseamento de proteínas pelo método BCA

O BCA é um ensaio colorimétrico utilizado para a deteção e quantificação total de proteínas e, neste trabalho, também foi utilizado para avaliar a adesão celular. Neste método ocorre redução dos catiões cobre (Cu²⁺) a cobre cuproso (Cu⁺) na presença de proteínas, em meio alcalino. Numa segunda fase duas moléculas de BCA reagem com o cobre reduzido (Cu⁺) cujo produto da reação é um complexo de cor púrpura com absorvância máxima no comprimento de onda de 562 nm. A quantidade de Cu²⁺ reduzido é proporcional à concentração de proteína presente na amostra (69).

Para este ensaio, preparou-se um controlo inicial, denominado controlo To, no qual se retiraram 3,43mL da suspensão celular para um *falcon* e adicionou-se meio de cultura até aos 8mL. Deste volume, retiraram-se 2mL para um novo *falcon* e centrifugou-se a suspensão a 100 RCF durante 5 minutos. Descartou-se o meio de cultura, adicionaram-se 2mL de PBS para ressuspender as células e centrifugou-se novamente. Por fim, removeu-se o sobrenadante e congelou-se o *falcon*, pelo menos durante 24horas. Depois de descongelar o *falcon*, adicionaram-se 80 μL de PBS e adicionaram-se 800 μL da mistura de reagentes presente *Pierce™ BCA Protein Assay Kit*. O *falcon* foi envolvido com papel de alumínio e incubado a 37°C durante 30 minutos.

A quantificação de proteínas nas células MCF-7 expostas ao 17 β -estradiol e ao extrato de soja foi realizada do seguinte modo: 48h após a incubação das células com os compostos em estudo aspirou-se o meio de cultura dos poços e adicionaram-se 800 μL de PBS. Aspirou-se

o PBS e procedeu-se ao congelamento da placa a -20°C durante pelo menos 24 horas. Posteriormente, retirou-se a placa do congelador e adicionaram-se $80\mu\text{L}$ de PBS e $800\mu\text{L}$ da mistura de reagentes presente *PierceTM BCA Protein Assay Kit*. A placa foi envolvida com papel de alumínio de forma a protegê-la da luminosidade e incubada a 37°C por 30 minutos.

As amostras foram transferidas para uma placa de 96 poços onde se leu as absorvâncias no espectrofotómetro de microplacas (Bio-Rad xMark) a 562 nm . Calculou-se a média das absorvâncias e determinou-se a respetiva concentração total de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

A curva de calibração (absorvância versus concentração ($\mu\text{g}/\text{mL}$)) foi preparada de acordo com o protocolo do *kit* utilizando padrões com diferentes concentrações de Albumina de Soro Bovino (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e $0\mu\text{g}/\text{mL}$. Para a placa de 96 poços, adicionaram-se $25\mu\text{L}$ de cada padrão para cada poço, em triplicado, e adicionaram-se $200\mu\text{L}$ da mistura de reagentes.

3.10.3. Ensaio de determinação da atividade enzimática da aromatase

Este ensaio utiliza um substrato fluorogénico da aromatase (*Fluorogenic Aromatase Substrate*) que é convertido num metabolito fluorescente detetado na zona do visível (Ex/Em= $488/527\text{nm}$). O *kit* possui um inibidor não esteroide altamente seletivo da aromatase, o letrozol, permitindo o cálculo da atividade específica da aromatase.

Tabela 2. Constituição do Aromatase (CYP19A) Activity Assay Kit para o ensaio de determinação da atividade enzimática da aromatase.

Componentes do kit
<i>Aromatase Assay Buffer</i>
<i>Fluorescence Standard (1mM)</i>
<i>Aromatase Inhibitor (letrozol)</i>
<i>NADPH Generating System (100X)</i>
<i>β-NADP⁺ Stock (100X)</i>
<i>Aromatase Substrate</i>
<i>Recombinante Human Aromatase</i>

Para ocorrer a aromatização dos androgénios em estrogénios é necessário ocorrer a transferência de eletrões entre a redutase NADPH-citocromo P450 (CPR) e a aromatase, na presença de oxigénio (Figura 16).

A CPR é uma enzima que permite a transferência de elétrons do NADPH para proteínas do citocromo P450 e outras proteínas com o grupo heme como é o caso da aromatase.

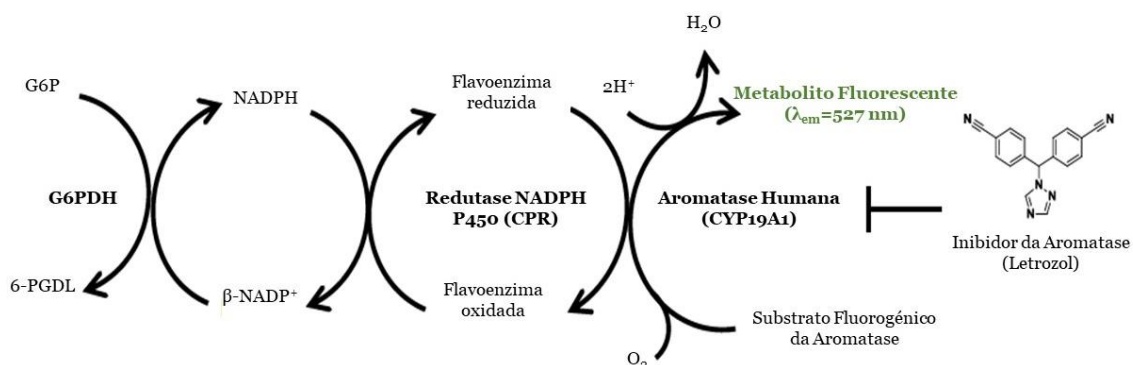


Figura 16. Reação de conversão do substrato fluorogênico da aromatase no metabolito fluorescente. Adaptado do protocolo do *Aromatase (CYP19A) Activity Assay Kit*. 6-PGDL- 6-fosfogluconolactona, CPR - Redutase NADPH-citocromo P450, G6P- Glicose 6-fosfato, G6PDH-Glicose-6-fosfato desidrogenase, NADPH- Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido, β-NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado.

Antes da realização deste ensaio, foi necessário otimizar as condições de trabalho indicadas no *kit*, nomeadamente os volumes de lisado celular, *NADPH⁺ Generating System* e *Aromatase Assay Buffer* a utilizar. Estas otimizações foram desenvolvidas pelo grupo de investigação no qual este projeto se insere.

3.10.3.1. Preparação das soluções

Para o ensaio, foram preparadas as seguintes soluções:

- ***Aromatase Inhibitor* (letrozol, 5μM):** foi reconstituído todo o conteúdo do frasco de inibidor com 55μL de acetonitrilo, originando uma solução de letrozol com 1mM. Desta retiraram-se 5μL, aos quais se adicionaram 995μL de *Aromatase Assay Buffer* dando origem à solução trabalho *Aromatase Inhibitor* 5μM.
- ***NADPH⁺ Generating System* (100X):** reconstituiu-se o conteúdo de todo o frasco com 220μL de *Aromatase Assay Buffer*.
- ***Solução β-NADP⁺ Stock* (100X):** reconstituiu-se todo o conteúdo do frasco de β-NADP⁺ com 110μL de *Aromatase Assay Buffer*.

- *Aromatase Substrate 1mM*: foi reconstituído o conteúdo do frasco com 55µL de acetonitrilo.
- *Recombinant Human Aromatase*: reconstituiu-se o conteúdo do frasco com 20µL da solução *NADPH⁺ Generating System (100X)* e 230µL de *Aromatase Assay Buffer*. Esta solução apenas foi preparada aquando da sua utilização para a realização do ensaio.

3.10.3.2. Preparação da curva de calibração

Prepararam-se os reagentes e os padrões para a curva de calibração segundo o protocolo do *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit (Fluorometric)*. A curva de calibração foi preparada a partir de uma solução *Fluorescence Standard* com uma concentração de 0,5 µM. Para tal, diluíram-se 10µL do vial de *Fluorescence Standard* em 990µL de *Aromatase Assay Buffer* obtendo uma solução de concentração final de 10µM. Desta solução retiraram-se 50µL que foram diluídos em 950µL de *Aromatase Assay Buffer*, dando origem a uma solução *Fluorescence Standard* 0,5 µM.

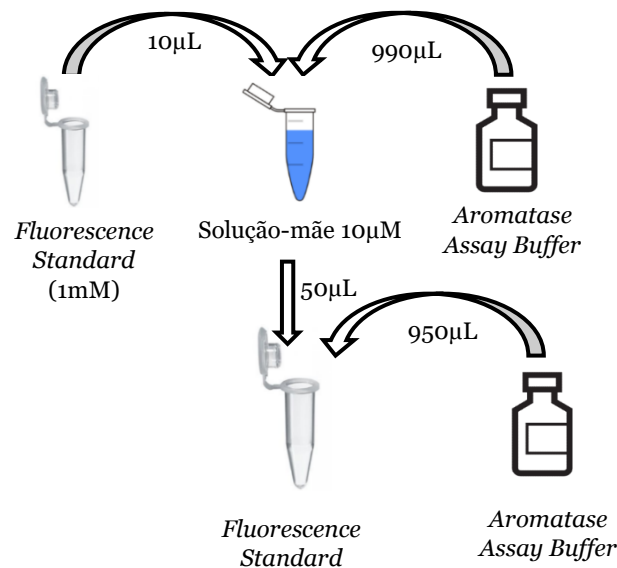


Figura 17. Preparação da solução de *Fluorescence Standard* 0,5 µM.

Para a reta de calibração prepararam-se numa placa *multiwell* de fundo branco, 8 poços com as seguintes concentrações de *Fluorescence Standard* 0,5 µM: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 e 10 pmole/poço. O volume total de cada poço foi ajustado para 100µL com *Aromatase Assay Buffer*.

Posteriormente, a fluorescência foi medida em comprimentos de onda entre os 485 e 538 nm num fluorómetro de microplacas.

Os valores de fluorescência obtidos foram corrigidos, subtraindo o valor da fluorescência do branco (Opml/poço) a todos os outros *Fluorescence Standard*, obteve-se a reta de calibração e a respetiva equação.

3.10.3.3. Preparação das amostras e realização do ensaio

Após 48h de incubação das células com os compostos em estudo (secção 3.7), procedeu-se ao ensaio de determinação da Atividade Específica da Aromatase.

Numa primeira etapa preparam-se as amostras, para tal retirou-se o meio de cultura e adicionou-se 800µL de PBS para a lavagem dos poços. Adicionou-se novamente PBS e com o auxílio do *cell scraper* removeram-se as células aderidas e transferiu-se o conteúdo de cada poço para um *ependorf*. Centrifugaram-se as amostras durante 5 min a 125 RCF tendo-se descartado o sobrenadante. Após este passo, procedeu-se segundo o protocolo do *kit*. Adicionaram-se 200 µL de *Aromatase Assay Buffer* gelado a cada *ependorf*, maceraram-se as células com um pilão e incubaram-se em gelo durante 5 minutos. De seguida, centrifugaram-se os diferentes *ependorfs* com os lisados celulares, a 14 000g durante 15 min a 4°C. Transferiram-se os sobrenadantes para novos *ependorfs* e foram congelados a -80°C até ao ensaio.

Numa segunda fase, procedeu-se à preparação das reações na presença e ausência do inibidor da aromatase (*Aromatase Inhibitor*, letrozol 5µM). Este ensaio foi realizado em triplicado numa placa *multiwell* de fundo branco de 96 poços. Descongelaram-se os *ependorfs* com os lisados celulares. Em cada poço adicionaram-se 12 µL do lisado celular, 2 µL de *NADPH⁺ Generating System* (100X) e 36 µL de *Aromatase Assay Buffer*. Para perfazer um volume final de 70 µL adicionaram-se 20 µL de *Aromatase Assay Buffer* nos poços correspondentes ao ensaio na ausência do inibidor e 20 µL de *Aromatase Inhibitor* (5µM) nos poços correspondentes ao ensaio na presença do inibidor da aromatase (*Positive Inhibition Control*) (Figura 18).

Para além destes, foram preparados controlos de forma a garantir o correto funcionamento do *kit* nomeadamente:

- *Background* (controlo negativo) = 70µL de *Aromatase Assay Buffer*
- *Aromatase PC* (controlo positivo) = 25µL de *Recombinant Human Aromatase* + 45µL de *Aromatase Assay Buffer*
- *PC + Inhibitor* = 25µL de *Recombinant Human Aromatase* + 20µL de letrozol 5µM + 25µL de *Aromatase Assay Buffer*.

A placa foi incubada por 10 minutos a 37°C. Durante a incubação, foi necessário preparar a mistura *Aromatase Substrate/NADP⁺* (3X) através da adição de 6µL *Aromatase Substrate* e 50µL de Solução *β-NADP⁺ Stock* (100X) a 1444µL de *Aromatase Assay Buffer*. Imediatamente antes da medição da fluorescência, adicionaram-se 30µL da mistura a cada poço. A fluorescência foi medida no comprimento de onda entre os 485 e 538 nm em modo cinético, em intervalos de um minuto, durante 60 minutos a 37°C.

A atividade da aromatase foi determinada a partir da conversão do substrato fluorogênico num metabolito fluorescente detetado na gama do visível e expresso em µU / mg.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0 pmole	Controlo	Controlo	Controlo	Controlo	Controlo	Controlo					
B	1 pmole	2nM de 17-β-estradiol	2nM de 17-β-estradiol	2nM de 17-β-estradiol	2nM de 17-β-estradiol	2nM de 17-β-estradiol	2nM de 17-β-estradiol					
C	2 pmole	0,021875 µg/µL de Soja	0,021875 µg/µL de Soja	0,021875 µg/µL de Soja	0,021875 µg/µL de Soja	0,021875 µg/µL de Soja	0,021875 µg/µL de Soja					
D	3 pmole	0,0875 µg/µL de Soja	0,0875 µg/µL de Soja	0,0875 µg/µL de Soja	0,0875 µg/µL de Soja	0,0875 µg/µL de Soja	0,0875 µg/µL de Soja					
E	4 pmole	Background	Background	Background	Aromatase PC	Aromatase PC	Aromatase PC					
F	6 pmole	PC + inhibitor	PC + inhibitor	PC + inhibitor								
G	8 pmole											
H	10 pmole											

Figura. 18. Representação esquemática da placa multiwell de 96 poços para a determinação da atividade específica da aromatase.

Legenda:

■ - Reações na ausência do inibidor = 12 µL do lisado celular + 2 µL de NADPH+ *Generating System* (100X) + 56 µL de *Aromatase Assay Buffer*

■ - Reações na presença do inibidor = 12 µL do lisado celular + 2 µL de NADPH+ *Generating System* (100X) + 36 µL de *Aromatase Assay Buffer* + 20 µL *Aromatase Inhibitor* (5µM)

■ - Background = 70µL de *Aromatase Assay Buffer*

■ - *Aromatase PC* = 25µL de *Recombinant Human Aromatase* + 45µL de *Aromatase Assay Buffer*

■ - PC + *Inhibitor* = 25µL de *Recombinant Human Aromatase* + 20µL de letrozol 5µM + 25µL de *Aromatase Assay Buffer*.

■ - Padrões para a reta de calibração do kit.

3.10.4. Cálculo da Atividade Específica da Aromatase

Para calcular a atividade Específica da Aromatase seguiram-se as instruções do protocolo do *Aromatase (CYP19A1) Activity Assay kit (fluorometric)*.

Para cada reação (amostras e controlos do kit) selecionaram-se dois tempos (T_1 e T_2) na fase linear na curva da reação. A partir destes pontos, calculou-se a média dos valores de fluorescência para cada amostra e controlo, denominados RFU_1 e RFU_2 .

Ao observar os gráficos seguintes (gráficos 1, 2 e 3), verifica-se que a fase linear se situa aproximadamente entre 1 minuto e os 5 minutos, pelo que, estes foram os tempos escolhidos para a realização dos cálculos.

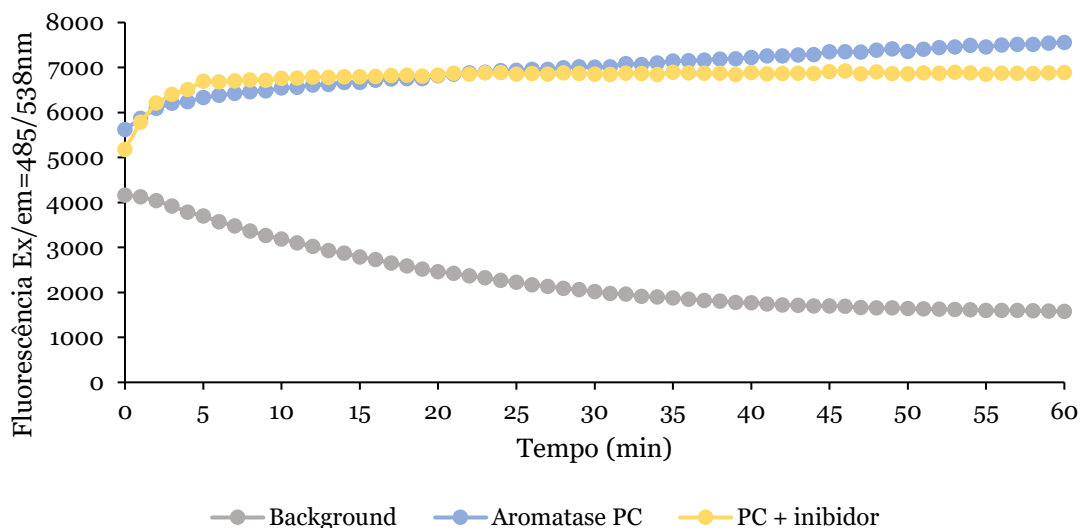


Gráfico 1. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase. Background (controle negativo); Aromatase PC (controle positivo); PC + inibidor (controle positivo + letrozol).

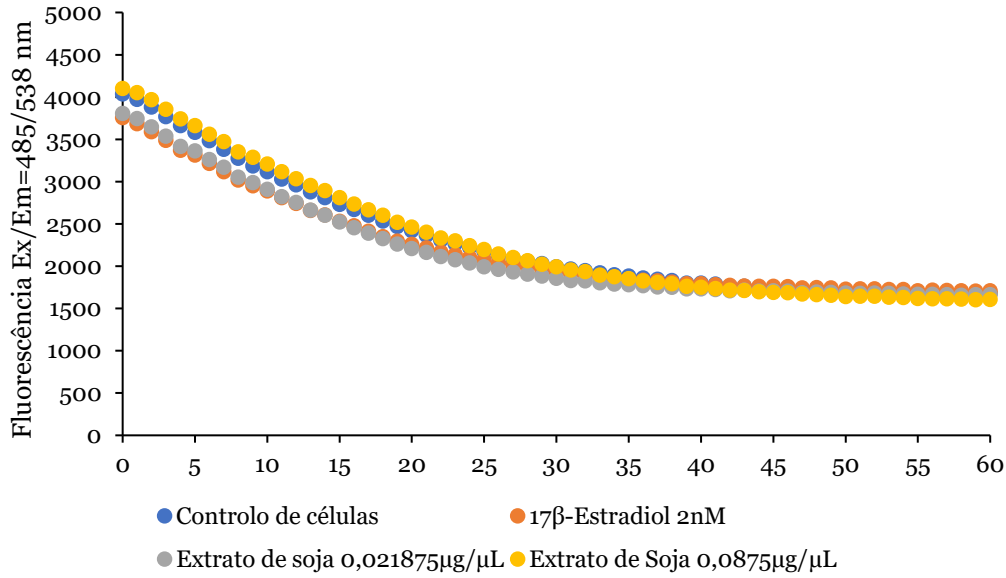


Gráfico 2. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na ausência do inibidor da aromatase e na presença dos compostos em estudo 17β-Estradiol 2nM, Extrato de Soja 0,021875 µg/µL e Extrato de Soja 0,0875 µg/µL.

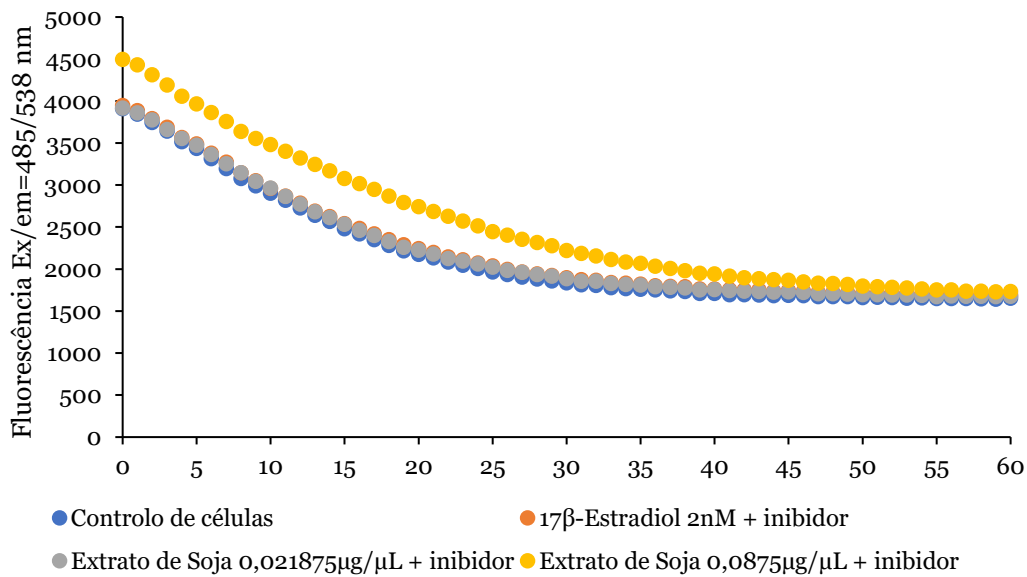


Gráfico 3. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença do inibidor da aromatase e dos compostos em estudo, 17β-Estradiol 2nM, Extrato de Soja 0,021875 µg/µL e Extrato de Soja 0,0875 µg/µL.

Posteriormente, calculou-se a variação da fluorescência para cada amostra ao longo do tempo, denominada ΔF , com auxílio das seguintes equações:

$$\text{Variação da Fluorescência das amostras: } \Delta F_s = RFU_2 - RFU_1 \quad (1)$$

$$\text{Variação da Fluorescência das amostras na presença do inibidor: } \Delta F_I = RFU_2 - RFU_1 \quad (2)$$

$$\text{Variação da Fluorescência do Background: } \Delta F_{BC} = RFU_2 - RFU_1 \quad (3)$$

Para calcular a fluorescência específica produzida pela atividade da aromatase, denominada C_S , utilizou-se a equação 4. Para tal, dever-se-ia corrigir a intensidade da fluorescência de cada amostra, ou seja, subtrair o valor da fluorescência do Background (ΔF_{BC}) à fluorescência das amostras (ΔF_s) e à fluorescência das amostras na presença do inibidor (ΔF_I). No entanto, como o valor de ΔF_{BC} obtido neste ensaio foi negativo ($\Delta F_{BC} = -431,11$) excluiu-se este passo, tal como sugerido pelo protocolo.

$$C_S = (\Delta F_s - \Delta F_{BC}) - (\Delta F_I - \Delta F_{BC}) \Leftrightarrow C_S = \Delta F_s - \Delta F_I \quad (4)$$

Onde:

C_S corresponde à fluorescência específica produzida pela atividade da aromatase

ΔF_s corresponde à fluorescência das amostras

ΔF_I corresponde à fluorescência das amostras na presença de inibidor

ΔF_{BC} corresponde à fluorescência do Background

De forma a obter a quantidade de metabolito produzido pela reação em pmoles, denominado B, aplicaram-se os valores de C_S à equação da curva de calibração do ensaio.

Adicionalmente, foi necessário realizar o ensaio de doseamento de proteínas totais para determinar a quantidade de proteína, em mg, existente em cada poço, denominado P.

Todos estes valores foram utilizados para o cálculo da atividade específica da aromatase como se demonstra na seguinte equação:

$$\text{Atividade Específica da Aromatase (CYP19A1)} = \frac{B}{\Delta T \times P} \mu U / mg \quad (5)$$

Onde:

B corresponde à quantidade de metabolito produzido pela reação em pmoles

ΔT corresponde à variação do tempo ($T_2 - T_1$) em minutos

P corresponde à quantidade de proteína existente em cada poço, em miligramas

A atividade específica da aromatase é medida em unidade (U) que corresponde à quantidade de enzima que produz 1µmole de metabolito fluorescente por minuto e por hidrólise de 1µmole de substrato da aromatase a 37°C e pH=8.

4. Análise e discussão de resultados

4.1. Doseamento de Proteínas Totais pelo método BCA e Adesão celular

Quantificou-se a proteína resultante das células MCF-7 que aderiram à superfície após 48h para estudar a influência das amostras 17β-estradiol 2nM, extrato de soja 0,021875µg/µL e extrato de soja 0,0875 µg/µL na adesão celular.

Partindo dos valores de absorvância medidos, calculou-se a concentração de proteínas totais das amostras e dos controlos, recorrendo à equação da curva de calibração (Gráfico 3). Os resultados obtidos estão representados nos Gráficos 4 e 5 e na Tabela 3.

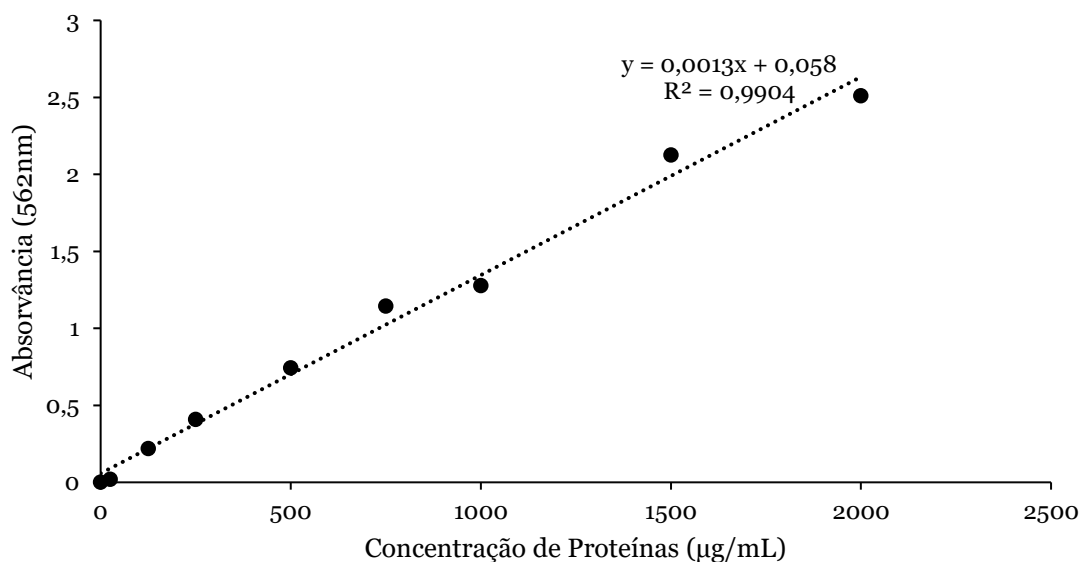


Gráfico 4. Curva de calibração do Ensaio de Doseamento de Proteínas Totais.

Tabela 3. Concentração de proteínas totais e percentagem de adesão celular para cada amostra.

Amostra	Concentração de Proteínas totais (µg/mL)	Adesão celular (%)
Controlo T ₀	720,000	100*
Controlo	253,654	35,2
17β-Estradiol 2nM	224,103	31,1
Extrato de Soja 0,021875µg/µL	222,462	30,9
Extrato de Soja 0,0875µg/µL	264,615	36,8

*Nota: Controlo T₀ corresponde à quantidade total de células que foram adicionadas a cada poço. Considerámos, por isso, ser o valor teórico de 100% de proteínas totais.

No geral, a concentração de proteínas foi praticamente idêntica entre as concentrações testadas, apresentando um valor próximo do controlo.

Mais em detalhe, nas células expostas a 17β-estradiol 2nM e extrato de soja 0,021875µg/µL verifica-se uma ligeira diminuição da quantidade de proteínas totais comparativamente ao controlo. Na presença de extrato de soja 0,0875µg/µL observa-se uma maior adesão celular, apesar da diferença entre os valores apresentados não ser estatisticamente significativa.

Destes resultados pode-se concluir que o 17β-estradiol 2nM e os extratos de soja 0,021875 µg/µL e 0,0875µg/µL não alteram a adesão das células MCF-7.

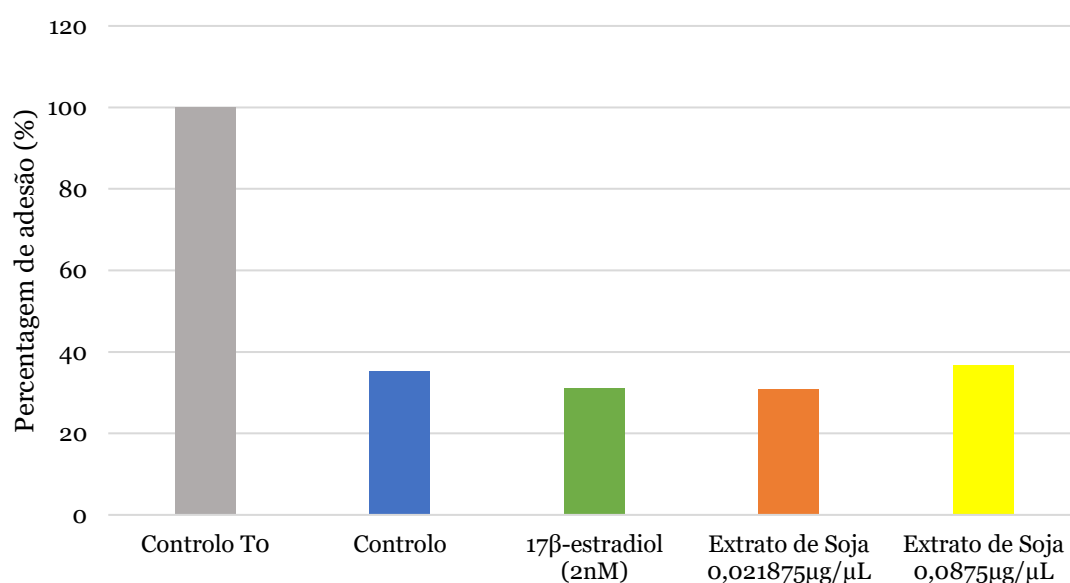


Gráfico 5. Percentagem de adesão celular das células MCF-7 tratadas apenas com meio de cultura (controlo), 17β -Estradiol 2nM, Extrato de Soja 0,021875 μ g/ μ L e Extrato de Soja 0,0875 μ g/ μ L comparativamente às células iniciais, Controlo To.

Com base no gráfico 5, os resultados evidenciam uma diminuição acentuada da adesão celular comparativamente ao controlo To (volume de células iniciais, sem incubação). Ao comparar os valores do controlo com o controlo To verifica-se que apenas uma fração das células aderiram à placa *multiwell* e mantiveram-se viáveis durante as 48h. Este resultado demonstra uma rentabilidade de adesão celular cerca de 35%.

Comparando os valores de adesão celular das células MCF-7 entre o controlo e os valores das células tratadas com a concentração de extrato de soja 0,0875 μ g/ μ L observa-se um ligeiro aumento da adesão celular que ronda os 5% (resultado não mostrado). Como alguns constituintes da soja, nomeadamente as isoflavonas têm maior afinidade para o ER- β , o aumento ligeiro da adesão celular verificado para a concentração mais elevada de extrato de soja poderá dever-se à ativação deste recetor por parte das isoflavonas. Há autores que referem que a genisteína apresenta capacidades de promover adesão de células cancerígenas da próstata, *in vitro* (70,71).

Desta forma, pode-se concluir que os extratos de soja estudados têm um papel idêntico ao estradiol na adesão celular, uma vez que os resultados obtidos são muito próximos.

Tendo por base estes resultados, apenas as células que estavam viáveis aderiram à *multiwell* podendo concluir-se que os compostos não impediram a adesão celular. Em particular, o extrato de soja 0,0875 μ g/ μ L demonstrou contribuir para uma maior adesão celular, comparativamente ao 17β -estradiol 2nM e ao extrato de soja 0,021875 μ g/ μ L.

4.2. Determinação da Atividade da Aromatase em células MCF-7

O ensaio de determinação da atividade da aromatase foi realizado em células MCF-7 incubadas com 17β -estradiol 2nM e extrato de soja nas concentrações de 0,021875 μ g/ μ L e 0,0875 μ g/ μ L. Para a realização deste ensaio recorreu-se ao *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit*, tendo-se determinado a fluorescência do metabolito formado pelo substrato fluorogénico da aromatase ao longo de 60 min. Realizaram-se as reações simultâneas na presença e ausência do letrozol para garantir a inibição seletiva da aromatase (ver secção 3.10.3.3).

Os resultados obtidos da cinética do metabolismo e da atividade específica da aromatase estão representados nos Gráficos 6 – 10.

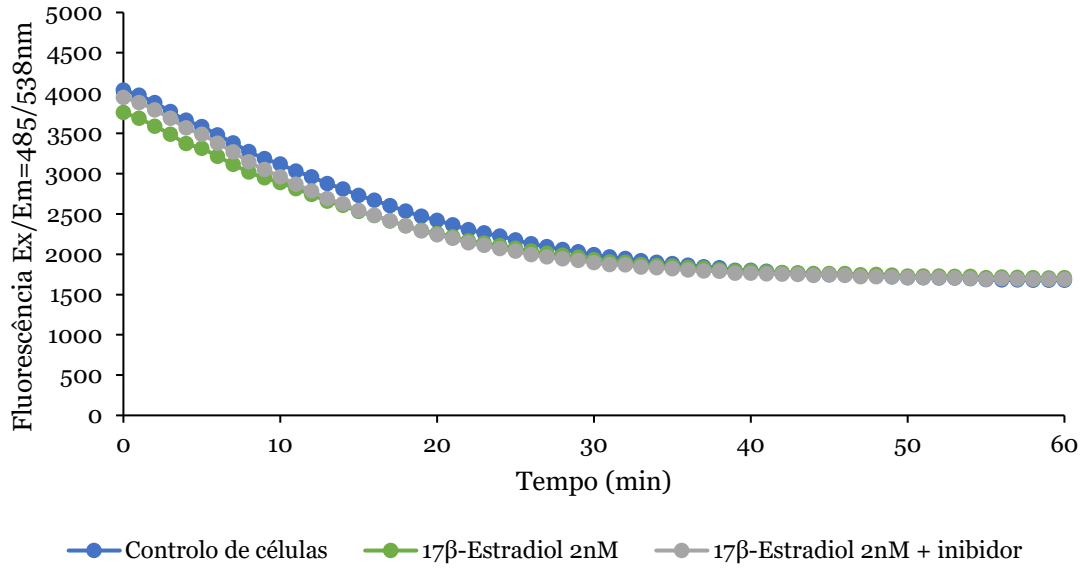


Gráfico 6. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase nas células MCF-7 tratadas com 17β-Estradiol 2nM.

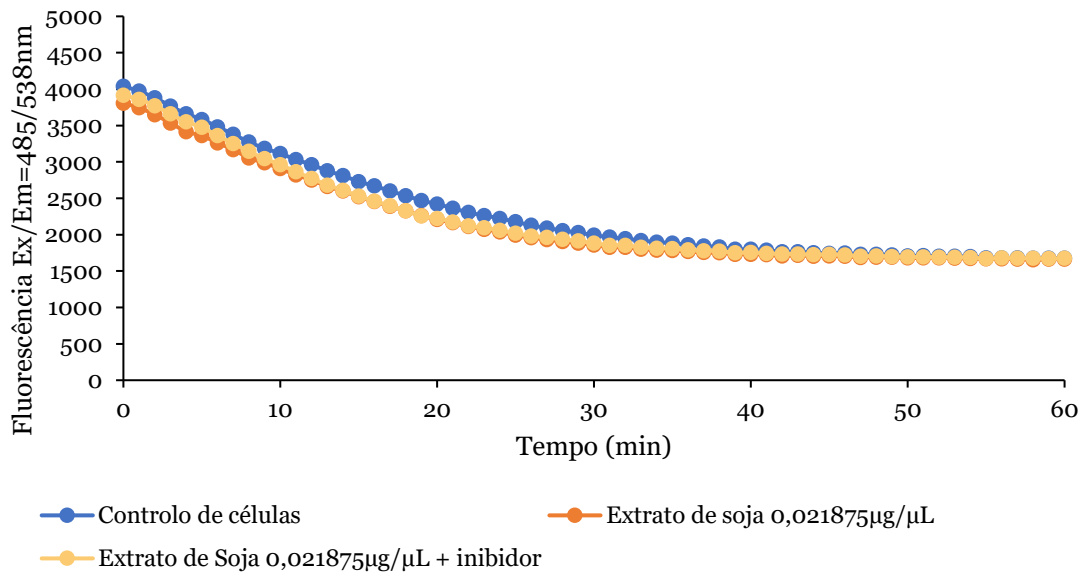


Gráfico 7. Cinética do metabolismo do substrato fluorogénico na presença e ausência do inibidor da aromatase nas células MCF-7 tratadas com Extrato de Soja 0,021875µg/µL.

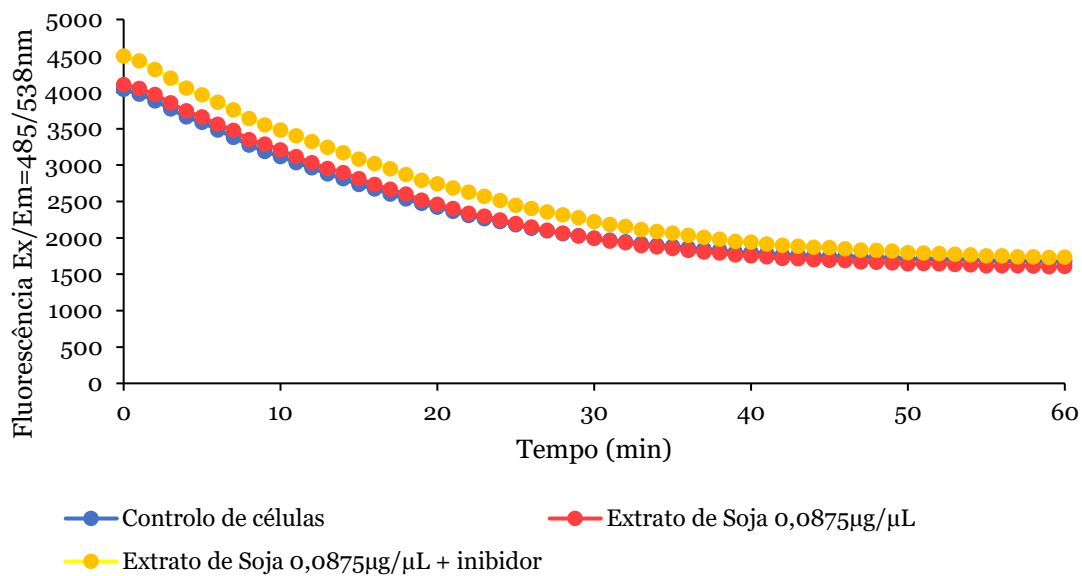


Gráfico 8. Cinética do metabolismo do substrato fluorogênico na presença e ausência do inibidor da aromatase nas células MCF-7 tratadas com Extrato de Soja 0,0875µg/µL.

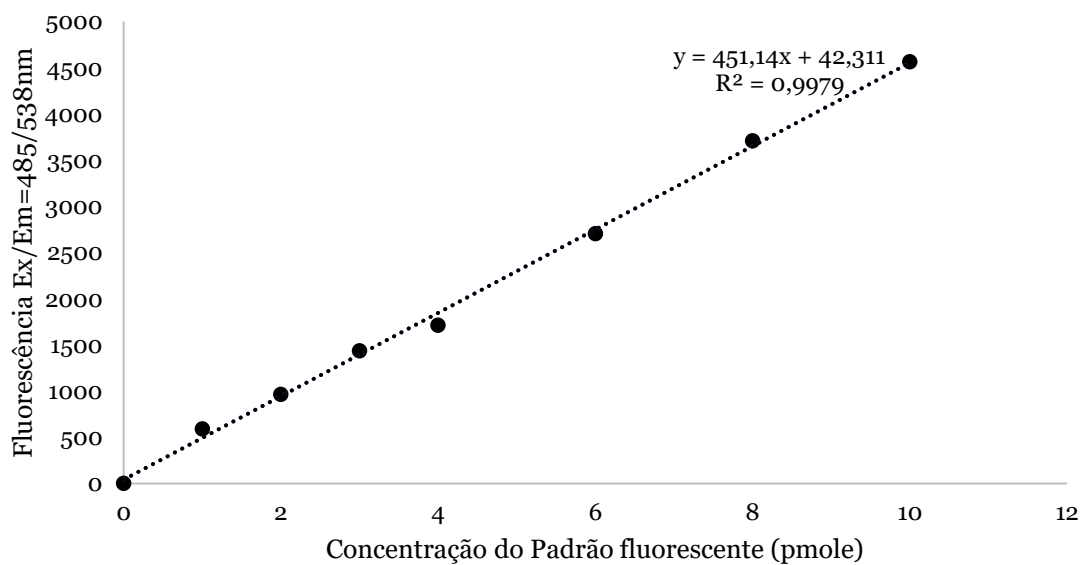


Gráfico 9. Curva de calibração da atividade específica da Aromatase.

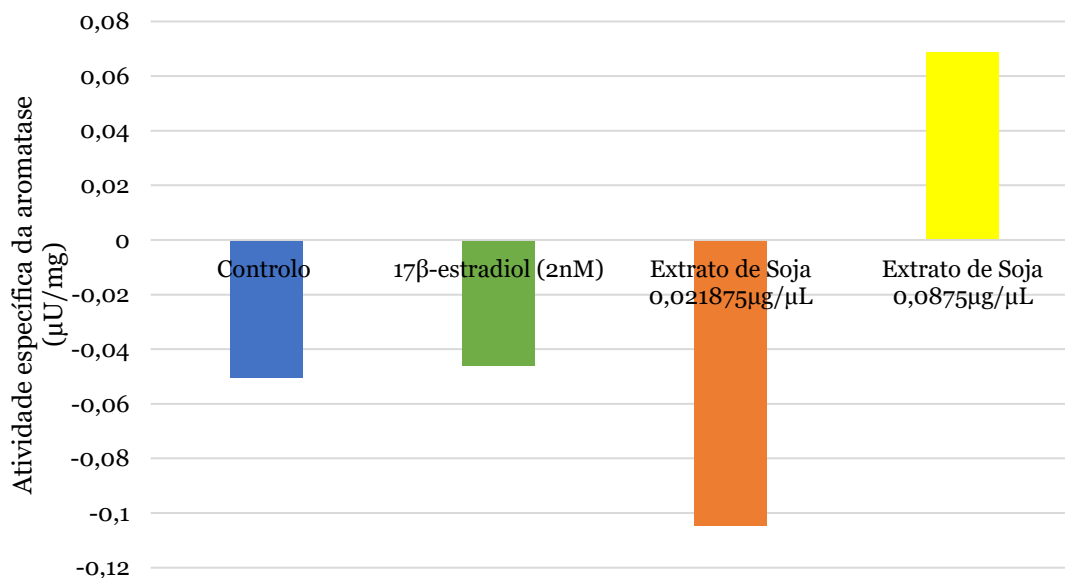


Gráfico 10. Atividade Específica da Aromatase em células MCF-7.

Pela análise dos gráficos 6,7 e 8 observa-se que a atividade aromatase das células MCF-7 tratadas com extrato de soja 0,0875µg/µL não foi inibida pelo letrozol.

Seria de esperar que se verificasse alguma atividade desta enzima na presença de 17β-estradiol 2nM e de extrato de soja 0,021875µg/µL (Gráfico 10) (60,72). No entanto, para as células tratadas com estes compostos, também não se verifica uma alteração da cinética do metabolismo em relação ao controlo (Gráficos 6 e 7).

Tais resultados podem-se justificar por uma das seguintes razões:

- Não existe qualquer atividade da aromatase nas células MCF-7 incubadas apenas com meio de cultura, 17β-estradiol 2nM ou extrato de soja 0,021875µg/µL;

ou,

- A sensibilidade do *kit* não é suficiente para detetar níveis tão baixos de atividade da aromatase como os que se verificam com o controlo, 17β-estradiol 2nM e extrato de soja 0,021875µg/µL.

A segunda hipótese parece ser mais provável, uma vez que se verifica atividade positiva da aromatase nas células incubadas com extrato de soja 0,0875µg/µL (Gráfico 10).

Este resultado pode estar associado a uma redução da inibição da atividade da aromatase na presença do letrozol por influência dos componentes dos extratos de soja, como por exemplo a genisteína.

Num estudo desenvolvido pelo grupo de investigação em que este trabalho está inserido, demonstrou-se que entre as duas principais isoflavonas presentes na soja, daidzeína e genisteína, a que contribuiu mais para aumentar a atividade da aromatase em células MCF-7 foi a genisteína particularmente com uma concentração de 50µM (73).

Evidencia-se que as concentrações testadas são diluições efetuadas a partir do pó de uma cápsula de um suplemento alimentar à base de soja. Perante estes resultados, verifica-se que existe atividade da aromatase com a concentração de extrato de soja mais elevada, contrariamente à concentração mais baixa estudada. Estes resultados indicam que, possivelmente, concentrações mais elevadas, por exemplo com a cápsula inteira, poderão ter maior influência na atividade da aromatase. Esta hipótese corrobora com o efeito dose-dependente da genisteína na atividade da aromatase demonstrado por Mylimaki e colaboradores (74).

Segundo a literatura, a influência da soja e suas isoflavonas no cancro da mama, é muito controversa. Adicionalmente, o papel destas moléculas na atividade da CYP19A1 não está bem clarificado e continua a ser uma lacuna no conhecimento científico.

Alguns autores relatam que os extratos de soja inibem a atividade da aromatase em microsomas placentários humanos e até em células MCF-7aro (linha celular de cancro da mama com sobreexpressão da aromatase) (72).

Por outro lado, Myllymaki e colaboradores referem que a genisteína, estimula a atividade da aromatase em culturas de folículos ovarianos isolados de ratos e van Dursen e colaboradores demonstraram que a genisteína não só induziu a expressão e atividade da aromatase em células MCF-7 como reduziu a atividade do Fadrozol (inibidor da aromatase) numa co-cultura de células MCF-7 e BAFs (Fibroblastos adiposos da mama) (74,75). Este último grupo mostrou ainda que numa outra co-cultura de células MCF-7 e H295R (células de adenocarcinoma humano) tratadas com genisteína o efeito inibitório do letrozol no crescimento celular foi diminuído, levando a conclusão de que a genisteína consegue alterar a ação do letrozol e estimular o crescimento de tumores hormono-dependentes (75).

Contudo, destaca-se que estudos realizados por outros investigadores para avaliar a influência da soja e suas isoflavonas na atividade da aromatase, utilizados para discutir os resultados obtidos por este estudo, foram desenvolvidos em condições diferentes das utilizadas neste trabalho, nomeadamente com células e tecidos distintos. No entanto, sabe-se que a atividade da aromatase é específica de cada tecido, por envolver a ativação de diferentes promotores consoante o tecido.

Os resultados obtidos mostram que concentrações mais elevadas do extrato de soja alteram a atividade da aromatase em células de cancro da mama e diminuem a eficácia do letrozol,

podendo as doses terapêuticas do letrozol não ser suficientes para inibir a aromatase e, conseqüentemente, a proliferação de células tumorais estimuladas pelos fitoestrogénios presentes nos extratos de soja.

Uma vez que, muitas mulheres com cancro da mama utilizam suplementos à base de soja e de isoflavonas como alternativa à terapêutica hormonal de substituição, para atenuar os efeitos da menopausa, é relevante alertar as mulheres com cancro da mama cuja terapêutica seja um inibidor da aromatase e que cumulativamente ingiram suplementos à base de soja para uma possível diminuição da eficácia do tratamento do cancro da mama dependente de estrogénios.

5. Conclusões e perspetivas futuras

Os compostos estrogénicos estudados (17β -estradiol 2nM, extrato de soja 0,021875 μ g/ μ L e extrato de soja 0,0875 μ g/ μ L) não impedem a adesão das células MCF-7 à superfície de crescimento. Particularmente, o extrato de soja 0,0875 μ g/ μ L foi o composto onde se verificou maior adesão celular.

A presença do extrato de soja na concentração mais elevada (0,0875 μ g/ μ L) promoveu a atividade da aromatase e diminuiu a atividade inibitória do letrozol.

Quanto aos restantes compostos analisados, não se verificou atividade da aromatase, muito provavelmente devido à sensibilidade do *kit* ser inferior à atividade das amostras em análise. Este último aspeto direciona-nos a um trabalho futuro para aprofundar o conhecimento da influência dos extratos de soja na atividade da aromatase em células MCF-7 em concentrações superiores às utilizadas neste ensaio.

O *kit* comercial, *Aromatase (CYP19A) Activity Assay kit*, ainda não é dos métodos mais comumente utilizados na investigação científica, no entanto, este estudo permitiu conhecer melhor o funcionamento do mesmo e, futuramente, poderá ser utilizado para testar a influência de outros compostos na atividade da aromatase.

O consumo deste tipo de suplementos por mulheres em menopausa está a aumentar e em contrapartida os dados sobre os seus efeitos na saúde da mulher permanecem ambíguos. No geral, os resultados mostram que é necessário ter alguma cautela na toma de suplementos à base de soja em doentes com cancro hormono-dependente.

É necessário aprofundar o conhecimento sobre as interações dos suplementos à base de soja com a terapêutica utilizada na prática clínica, de forma a salvaguardar a saúde das mulheres.

6. Referências bibliográficas

1. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. Vol. 151, Progress in Molecular Biology and Translational Science. Elsevier Inc.; 2017. 1–32 p. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.07.002>
2. Anastasiadi Z, Lianos GD, Ignatiadou E, Harissis H V., Mitsis M. Breast cancer in young women: an overview. *Updates Surg.* 2017;69(3):313–8. <https://doi.org/10.1007/s13304-017-0424-1>
3. Tao ZQ, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys.* 2015;72(2):333–8. <https://doi.org/10.1007/s12013-014-0459-6>
4. Coughlin, S. S., Cypel, Y. Epidemiology of breast cancer in women. *Breast Cancer Metastasis and Drug Resistance.* 2013;19-34. Springer, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20301-6_2
5. Gonzalez TL, Rae JM, Colacino JA. Implication of environmental estrogens on breast cancer treatment and progression. *Toxicology.* 2019;421(October 2018):41–8. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.03.014>
6. Fuentes N, Silveyra P. Estrogen receptor signaling mechanisms [Internet]. 1st ed. Vol. 116, *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology.* Elsevier Inc.; 2019. 135–170 p. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
7. Zhao H, Zhou L, Shangguan AJ, Bulun SE. Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. *J Mol Endocrinol.* 2016;57(1):R19–33. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0310>
8. Bhardwaj P, Au CMC, Benito-Martin A, Ladumor H, Oshchepkova S, Moges R, et al. Estrogens and breast cancer: Mechanisms involved in obesity-related development, growth and progression. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;189:161–70. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.03.002>
9. Lu W, Katzenellenbogen BS. Estrogen Receptor- β Modulation of the ER α -p53 Loop Regulating Gene Expression, Proliferation, and Apoptosis in Breast Cancer. *Horm Cancer.* 2017;8(4):230–42. <https://doi.org/10.1007/s12672-017-0298-1>
10. Liang J, Shang Y. Estrogen and Cancer. *Annu Rev Physiol.* 2013;75(1):225–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>
11. Van Duursen MBM. Modulation of estrogen synthesis and metabolism by phytoestrogens: In vitro and the implications for women's health. *Toxicol Res (Camb).* 2017;6(6):772–94. <http://dx.doi.org/10.1039/c7tx00184c>
12. Saha T, Makar S, Swetha R, Gutti G, Singh SK. Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. *Eur J Med Chem.* 2019;177:116–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.023>
13. Okoh V, Deoraj A, Roy D. Estrogen-induced reactive oxygen species-mediated signalings contribute to breast cancer. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer.* 2011;1815(1):115–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.10.005>
14. Rothenberger NJ, Somasundaram A, Stabile LP. The role of the estrogen pathway in the tumor microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2018;19(2). <https://doi.org/10.3390/ijms19020611>
15. Hamilton KJ, Hewitt SC, Arao Y, Korach KS. Estrogen Hormone Biology. *Curr Top Dev Biol.* 2017;125:109–46. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005>

16. Jia M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ. Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(4):557–68. <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.2015.04.008>
17. Warner M, Huang B, Gustafsson JA. Estrogen Receptor β as a Pharmaceutical Target. *Trends Pharmacol Sci.* 2017;38(1):92–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tips.2016.10.006>
18. Liu WJ, Zhao G, Zhang CY, Yang CQ, Zeng X Bin, Li J, et al. Comparison of the roles of estrogens and androgens in breast cancer and prostate cancer. *J Cell Biochem.* 2020;121(4):2756–69. <https://doi.org/10.1002/jcb.29515>
19. Jameera Begam A, Jubie S, Nanjan MJ. Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorg Chem.* 2017;71:257–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.02.011>
20. Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J. The many faces of estrogen signaling. *Biochem Medica.* 2014;24(3):329–42. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>
21. Khan D, Ansar Ahmed S. The immune system is a natural target for estrogen action: Opposing effects of estrogen in two prototypical autoimmune diseases. *Front Immunol.* 2016;6(JAN):1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00635>
22. Di Sante G, Di Rocco A, Pupo C, Casimiro MC, Pestell RG. Hormone-induced DNA damage response and repair mediated by cyclin D1 in breast and prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(47):81803–12. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19413>
23. Yasuda MT, Sakakibara H, Shimoi K. Estrogen- and stress-induced DNA damage in breast cancer and chemoprevention with dietary flavonoid. *Genes Environ.* 2017;39(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0071-7>
24. Surekha D, Sailaja K, Rao DN, Padma T, Digumarthi, Raghunadharao, et al. Association of CYP19 polymorphisms with breast cancer risk: A case-control study. *J Nat Sci Biol Med.* 2014;5(2):250–4. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.136150>
25. Hong Y, Li H, Yuan YC, Chen S. Sequence-function correlation of aromatase and its interaction with reductase. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010;118(4–5):203–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.11.010>
26. Dai Y, Zhen J, Zhang X, Zhong Y, Liu S, Sun Z, et al. Analysis of the complex formation, interaction and electron transfer pathway between the “open” conformation of NADPH-cytochrome P450 reductase and aromatase. *Steroids.* 2015;101:116–24. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2015.06.006>
27. Chan HJ, Petrossian K, Chen S. Structural and functional characterization of aromatase, estrogen receptor, and their genes in endocrine-responsive and -resistant breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2016;161:73–83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.07.018>
28. Lephart ED. Modulation of aromatase by phytoestrogens. *Enzyme Res.* 2015;2015(c). <https://doi.org/10.1155/2015/594656>
29. Pistelli M, Della Mora A, Ballatore Z, Berardi R. Aromatase inhibitors in premenopausal women with breast cancer: The state of the art and future prospects. *Curr Oncol.* 2018;25(2):e168–75. <https://doi.org/10.3747/co.25.3735>
30. Hamadeh IS, Patel JN, Rusin S, Tan AR. Personalizing aromatase inhibitor therapy in patients with breast cancer. *Cancer Treat Rev.* 2018;70:47–55. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.014>

31. Ferreira Almeida C, Oliveira A, João Ramos M, Fernandes PA, Teixeira N, Amaral C. Estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer treatment: Are multi-target compounds the next promising approach? *Biochem Pharmacol.* 2020;177:113989. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113989>
32. Geisler J. Differences between the non-steroidal aromatase inhibitors anastrozole and letrozole- of clinical importance. *Br J Cancer.* 2011;104(7):1059–66. <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2011.58>
33. Ma CX, Reinert T, Chmielewska I, Ellis MJ. Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(5):261–75. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3920>
34. Waks AG, Winer EP. Breast Cancer Treatment: A Review. *JAMA - J Am Med Assoc.* 2019;321(3):288–300. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2018.19323>
35. Pan H, Gray R, Braybrooke J, Davies C, Taylor C, McGale P, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence After Stopping Endocrine Therapy At 5 Years. *N Engl J Med.* 2017;377(19):1836–46. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1701830>
36. Ruhstaller T, Giobbie-Hurder A, Colleoni M, Jensen MB, Ejlersen B, De Azambuja E, et al. Adjuvant letrozole and tamoxifen alone or sequentially for postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: Long-term follow-up of the BiG 1-98 trial. *J Clin Oncol.* 2019;37(2):105–14. <http://dx.doi.org/10.1200/JCO.18.00440>
37. Bradley R, Burrett J, Clarke M, Davies C, Duane F, Evans V, et al. Aromatase inhibitors versus tamoxifen in early breast cancer: Patient-level meta-analysis of the randomised trials. *Lancet.* 2015;386(10001):1341–52. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)61074-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)61074-1)
38. Niyibituronsa M, Onyango AN, Gaidashova S, Imathiu S, Uwizerwa M, Ochieng EP, et al. The effect of different processing methods on nutrient and isoflavone content of soymilk obtained from six varieties of soybean grown in Rwanda. *Food Sci Nutr.* 2019;7(2):457–64. <http://dx.doi.org/10.1002/fsn3.812>
39. He F-J, Chen J-Q. Consumption of soybean, soy foods, soy isoflavones and breast cancer incidence: Differences between Chinese women and women in Western countries and possible mechanisms. *Food Sci Hum Wellness.* 2013;2(3–4):146–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fshw.2013.08.002>
40. Rizzo G, Baroni L. Soy, soy foods and their role in vegetarian diets. Vol. 10, *Nutrients.* 2018. 1–51 p. <http://dx.doi.org/10.3390/nu10010043>
41. Colletti A, Attrovio A, Boffa L, Mantegna S, Cravotto G. Valorisation of by-products from soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) processing. *Molecules.* 2020;25(9):1–33. <https://doi.org/10.3390/molecules25092129>
42. Natarajan S, Luthria D, Bae H, Lakshman D, Mitra A. Transgenic soybeans and soybean protein analysis: An overview. *J Agric Food Chem.* 2013;61(48):11736–43. <http://dx.doi.org/10.1021/jf402148e>
43. Low Dog T. Menopause: A review of botanical dietary supplements. *Am J Med.* 2005;118(12 SUPPL. 2):98–108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2005.09.044>
44. Anlauf M, Hein L, Hense HW, Köbberling J, Lasek R, Leidl R, et al. Complementary and alternative drug therapy versus science-oriented medicine. *GMS Ger Med Sci.* 2015;13:1–47. <http://dx.doi.org/10.3205/000209>
45. Messina M. Soy and health update: Evaluation of the clinical and epidemiologic literature. *Nutrients.* 2016;8(12). <http://dx.doi.org/10.3390/nu8120754>

46. Křížová L, Dadáková K, Kašparovská J, Kašparovský T. Isoflavones. *Molecules*. 2019;24(6). <http://dx.doi.org/10.3390/molecules24061076>
47. Anandhi Senthilkumar H, Fata JE, Kennelly EJ. Phytoestrogens: The current state of research emphasizing breast pathophysiology. *Phyther Res*. 2018;32(9):1707–19. <https://doi.org/10.1002/ptr.6115>
48. Viggiani MT, Polimeno L, Di Leo A, Barone M. Phytoestrogens: Dietary intake, bioavailability, and protective mechanisms against colorectal neoproliferative lesions. *Nutrients*. 2019;11(8). <https://doi.org/10.3390/nu11081709>
49. Alexander V. S. Phytoestrogens and their effects. *Eur J Pharmacol*. 2014;741:230–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.057>
50. Rietjens IMCM, Louisse J, Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *Br J Pharmacol*. 2017;174(11):1263–80. <http://dx.doi.org/10.1111/bph.13622>
51. Desmawati D, Sulastri D. Phytoestrogens and their health effect. *Maced J Med Sci*. 2019;7(3):495–9. <http://doi.org/10.3889/oamjms.2019.086>
52. Chen FP, Chien MH. Effects of phytoestrogens on the activity and growth of primary breast cancer cells ex vivo. *J Obstet Gynaecol Res*. 2019;45(7):1352–62. <https://doi.org/10.1111/jog.13982>
53. Autrup H, Barile FA, Berry SC, Blaauboer BJ, Boobis A, Bolt H, et al. Human exposure to synthetic endocrine disrupting chemicals (S-EDCs) is generally negligible as compared to natural compounds with higher or comparable endocrine activity: how to evaluate the risk of the S-EDCs? *Arch Toxicol*. 2020;94(7):2549–57. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02800-8>
54. Baena Ruiz R, Salinas Hernández P. Cancer chemoprevention by dietary phytochemicals: Epidemiological evidence. *Maturitas*. 2016;94:13–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.maturitas.2016.08.004>
55. Chen LR, Ko NY, Chen KH. Isoflavone supplements for menopausal women: A systematic review. *Nutrients*. 2019;11(11):1–15. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11112649>
56. Walsh KR, Haak SJ, Bohn T, Tian Q, Schwartz SJ, Failla ML. Isoflavonoid glucosides are deconjugated and absorbed in the small intestine of human subjects with ileostomies. *Am J Clin Nutr*. 2007;85(4):1050–6. <http://dx.doi.org/10.1093/ajcn/85.4.1050>
57. Uifălean A, Schneider S, Ionescu C, Lalk M, Iuga CA. Soy Isoflavones and Breast Cancer Cell Lines: Molecular Mechanisms and Future Perspectives. *Molecules*. 2015;21(1):E13. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules21010013>
58. Basu P, Maier C. Phytoestrogens and breast cancer: In vitro anticancer activities of isoflavones, lignans, coumestans, stilbenes and their analogs and derivatives. *Biomed Pharmacother*. 2018;107(May):1648–66. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.100>
59. Xiao Y, Zhang S, Tong H, Shi S. Comprehensive evaluation of the role of soy and isoflavone supplementation in humans and animals over the past two decades. *Phyther Res*. 2018;32(3):384–94. <http://doi.org/10.1002/ptr.5966>
60. Amaral C, Toloí MRT, Vasconcelos LD, Fonseca MJ V., Correia-Da-Silva G, Teixeira N. The role of soybean extracts and isoflavones in hormone-dependent breast cancer: Aromatase activity and biological effects. *Food Funct*. 2017;8(9):3064–74. <http://doi.org/10.1039/c7fo00205j>

61. Ziaei S, Halaby R. Dietary Isoflavones and Breast Cancer Risk. *Medicines*. 2017;4(4):18. <http://doi.org/10.3390/medicines4020018>
62. Wei YK, Gamra I, Davenport A, Lester R, Zhao L, Wei Y. Genistein induces cytochrome P450 1B1 gene expression and cell proliferation in human breast cancer MCF-7 cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2015;34(2):153–9. <http://doi.org/10.1615/jenvironpatholtoxicoloncol.2015013315>
63. Li Y, Li S, Meng X, Gan RY, Zhang JJ, Li H Bin. Dietary natural products for prevention and treatment of breast cancer. *Nutrients*. 2017;9(7):1–38. <http://doi.org/10.3390/nu9070728>
64. Levenson AS, Jordan VC. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res*. 1997;57(15):3071–8.
65. Choi EJ, Kim GH. Antiproliferative activity of daidzein and genistein may be related to ER α /c-erbB-2 expression in human breast cancer cells. *Mol Med Rep*. 2013;7(3):781–4. <http://doi.org/10.3892/mmr.2013.1283>
66. Chen W-F, Huang M-H, Tzang C-H, Yang M, Wong M-S. Inhibitory actions of genistein in human breast cancer (MCF-7) cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1638:187–96. [http://doi.org/10.1016/s0925-4439\(03\)00082-6](http://doi.org/10.1016/s0925-4439(03)00082-6)
67. Liu Y, Zou T, Wang S, Chen H, Su D, Fu X, et al. Genistein-induced differentiation of breast cancer stem/progenitor cells through a paracrine mechanism. *Int J Oncol*. 2016;48(3):1063–72. <http://doi.org/10.3892/ijo.2016.3351>
68. Poschner S, Maier-Salamon A, Zehl M, Wackerlig J, Dobusch D, Pachmann B, et al. The Impacts of Genistein and Daidzein on Estrogen Conjugations in Human Breast Cancer Cells: A targeted metabolomics approach. *Front Pharmacol*. 2017;8:1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00699>
69. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76–85.
70. Pavese JM, Farmer RL, Bergan RC. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(3):465–82. <http://doi.org/10.1007/s10555-010-9238-z>
71. Pavese JM, Krishna SN, Bergan RC. Genistein inhibits human prostate cancer cell detachment, invasion, and metastasis. *Am J Clin Nutr*. 2014;100(SUPPL. 1):431–6. <http://doi.org/10.3945/ajcn.113.071290>
72. Catalano S, Barone I, Giordano C, Rizza P, Qi H, Gu G, et al. Rapid estradiol/ER α signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2009;23(10):1634–45. <http://doi.org/10.1210/me.2009-0039>
73. Ferreira FC. Estudo do efeito da Genisteína e Daidzeína na atividade da aromatase de células MCF-7. Universidade da Beira Interior; 2020.
74. Myllymäki S, Haavisto T, Vainio M, Toppari J, Paranko J. In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005;204(1):69–80. <http://doi.org/10.1016/j.taap.2004.08.009>
75. Van Duursen MBM, Nijmeijer SM, de Morree ES, de Jong PC, van den Berg M. Genistein induces breast cancer-associated aromatase and stimulates estrogen-dependent tumor cell growth in in vitro breast cancer model. *Toxicology*. 2011;289(2–3):67–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.005>

Capítulo II – Experiência Profissionalizante na vertente de Farmácia Comunitária

1. Introdução

A farmácia comunitária é, muitas vezes, o primeiro estabelecimento de saúde onde os cidadãos recorrem, principalmente, quando têm algum problema de saúde reconhecendo assim, a proximidade, disponibilidade, dedicação e a competência profissional dos farmacêuticos. A atividade do farmacêutico comunitário engloba um conjunto de cuidados farmacêuticos cada vez mais centrados no cidadão e nas suas necessidades. Além de promover o uso racional do medicamento, estes profissionais de saúde são capazes de proporcionar um suporte para as opções terapêuticas (farmacológicas ou não farmacológicas) mais adequadas ao utente em específico, assim como, um acompanhamento ativo da terapia, tanto a nível de segurança medicamentosa, como de efetividade (1).

Para garantir o elevado nível de qualificação dos futuros farmacêuticos, o estágio curricular torna-se uma mais valia para que os estudantes possam contactar com a realidade da farmácia comunitária e colocar em prática todos os conhecimentos técnico-científicos adquiridos durante o mestrado integrado.

O meu estágio decorreu entre 3 de fevereiro e 24 de julho (com seis semanas de interrupção devido ao Estado de Emergência declarado em Portugal) na Farmácia Vitória, sob a supervisão da Diretora Técnica, Dr^a Alcina Leal. Durante este período foi possível compreender toda a dinâmica associada à farmácia e aos farmacêuticos comunitários, assim como, desenvolver competências e capacidades para aplicar os conhecimentos teóricos em situações práticas da atividade farmacêutica.

1.1. Contextualização da legislação farmacêutica

A atividade farmacêutica é regulada por diversos órgãos entre os quais se destacam a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P. (INFARMED I.P.) e a Ordem dos Farmacêuticos. Atendendo às particularidades do setor, este encontra-se legislado por diversos diplomas nomeadamente pelo Decreto-lei n.º 307/2007, de 31 de agosto com conseqüentes alterações legislativas, onde se estabelece o regime jurídico das farmácias comunitárias (2).

Contudo, a legislação é complementada com normas de orientação clínica de forma a providenciar a todas as farmácias referências de qualidade segundo as quais se devem reger. Neste âmbito, a Ordem dos Farmacêuticos disponibiliza um conjunto de “Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária” onde constam normas que contribuem para melhorar os padrões e as práticas exercidas na farmácia (1).

2. Organização da Farmácia

2.1. Localização e horário de funcionamento

A Farmácia Vitória situa-se na Rua 5 de Outubro, na cidade do Fundão, distrito de Castelo Branco.

Relativamente ao horário de funcionamento, este encontra-se exposto na porta exterior visível a todos os utentes. A referida farmácia está aberta de segunda a sexta-feira entre as 8h30 e as 20h e aos sábados entre as 8h30 e as 13h. Além deste horário, e de forma rotativa de cinco em cinco semanas, este espaço de saúde está em serviço de disponibilidade, ou seja, durante uma semana (de quinta-feira a quinta-feira da semana seguinte) a farmácia está disponível para atender os utentes após o horário normal e em caso de urgências.

Durante o período de estágio o horário de funcionamento alterou-se temporariamente (8h30-19h) devido à declaração do estado de emergência nacional, em consequência da pandemia do SARS-COV 2 (novo coronavírus). Esta situação de saúde pública é abordada na secção nº16.

2.2. Caracterização do espaço

As instalações da farmácia estão em conformidade com a legislação em vigor, uma vez que reúnem todas as condições necessárias, de forma a garantir a segurança, conservação e preparação dos medicamentos e, também, a comodidade e a privacidade tanto dos colaboradores como dos utentes.

2.2.1. Espaço Exterior

A farmácia é facilmente identificável, pode-se observar um letreiro com o seu nome (“Farmácia Vitória”) e uma cruz verde luminosa, que se encontram iluminados sempre que a farmácia está de serviço permanente. Além disso, a cruz verde também fornece informações úteis, nomeadamente a temperatura, a hora e alguns serviços prestados. Para a dispensa de medicamentos durante o período de serviço permanente, a farmácia dispõe de um postigo que auxilia o atendimento ao utente (1).

Tal como mencionado anteriormente, na porta exterior está afixado o horário de funcionamento da farmácia, as escalas de turno do serviço de disponibilidade das diferentes farmácias do município e a respetiva localização. Na fachada da farmácia está visível uma placa com o nome da diretora técnica, Dr^a Alcina Leal. Todas estas informações estão ao dispor de qualquer cidadão, mesmo sem entrar na farmácia (1).

As montras são atualizadas regularmente com informações úteis para os utentes, campanhas promocionais, atividades desenvolvidas pela farmácia ou ajustadas com produtos de saúde consoante a época do ano.

Para aceder ao espaço interior, a farmácia dispõe de uma pequena rampa de acesso que facilita a entrada de todos os utentes.

2.2.2. Espaço Interior

O espaço interior da Farmácia Vitória é composto por diversas áreas, cujas dimensões se enquadram na legislação, encontrando-se distribuídas por dois pisos. Além das divisões exigidas por lei, nomeadamente uma sala de atendimento ao público, um armazém, um laboratório, instalações sanitárias para os utentes e um gabinete de atendimento personalizado, a farmácia possui um segundo armazém de apoio, um segundo gabinete de atendimento personalizado, um gabinete da direção técnica, uma sala de apoio informático, uma zona de receção de encomendas, instalações sanitárias para a equipa da farmácia e uma área de refeição (3).

No interior da farmácia, encontra-se uma zona ampla de atendimento ao público, que se caracteriza por apresentar seis balcões individualizados cada um com o equipamento/material necessário para o atendimento (um computador, um leitor ótico, impressora de faturas e outra de etiquetas de posologia, uma caixa registadora e um terminal multibanco), cadeiras para que os utentes possam esperar pela sua vez de forma mais cómoda, um sistema de senhas de atendimento e dois dispensadores, um de água e outro de desinfetante de mãos, gratuitos para o utente. Nesta zona, encontramos também os produtos de venda livre nomeadamente produtos de puericultura, ortopedia, podologia, de higiene corporal, dietéticos, perfumes, cosméticos e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Estes últimos encontram-se atrás dos balcões de atendimento, de forma a evitar o acesso direto pelos utentes. Adicionalmente, existem gavetas atrás dos balcões, onde estão armazenados os produtos com uma alta rotatividade para facilitar o atendimento.

Como referido anteriormente, nesta farmácia existem dois gabinetes de atendimento personalizado garantindo a privacidade e a comodidade dos utentes. Cada um deles está destinado a funções distintas. O primeiro está equipado com cadeiras, mesa, lavatório e

reservatórios específicos para a recolha de resíduos biológicos e é utilizado principalmente para a determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, nomeadamente glicémia, colesterol, triglicéridos e pressão arterial. O outro gabinete, maior do que o primeiro, possui marquesa, mesa, cadeiras, lavatório, um *Kit* de urgência, caso ocorra uma reação anafilática provocada por alguma vacina ou injetável, sendo utilizado para prestar alguns serviços que a farmácia disponibiliza aos seus utentes nomeadamente, a administração de injetáveis e de vacinas não incluídas no plano nacional de vacinação (PNV), troca de seringas, consultas de nutrição clínica e desportiva, consultas de podologia, testes de gravidez, testes *point of care* (ex: VIH e Streptococcus A) incluindo o aconselhamento pré e pós-teste, furação de orelhas, acompanhamento farmacêutico, entre outros. Esta divisão também é utilizada quando os farmacêuticos necessitam promover um atendimento mais personalizado e/ou com maior privacidade.

Quanto ao armazenamento dos medicamentos e produtos de saúde, estes estão organizados em diferentes locais por forma farmacêutica e sempre por ordem alfabética. Os medicamentos sujeitos a receita médica encontram-se num armário com gavetas deslizantes, enquanto que os medicamentos não sujeitos a receita médica estão distribuídos em diversas prateleiras na zona de armazém e em gavetas atrás do balcão de atendimento, como mencionado anteriormente. Junto ao armário existe também um frigorífico para armazenar produtos que requerem a conservação entre 2°C e 8°C.

No 1º andar, a zona de receção de encomendas está equipada com dois computadores, um telefone fixo e três impressoras, sendo uma delas para etiquetas.

No laboratório pode encontrar-se todos os materiais necessários à preparação de medicamentos manipulados, incluindo uma balança de precisão e um Unguator® que auxilia a preparação de medicamentos semi-sólidos. É possível encontrar algumas matérias primas mais comumente utilizadas (exemplo: vaselina), devidamente armazenadas em armários à temperatura ambiente. Junto a esta divisão existe uma biblioteca com a documentação científica atualizada e essencial à prática farmacêutica, nomeadamente o Formulário Galénico Português, a Farmacopeia Portuguesa, Manual de Boas Práticas em Farmácia Comunitária entre outros que serão abordados na secção nº 3.

2.3. Recursos Humanos

Os recursos humanos de uma farmácia têm um papel fundamental para garantir o uso adequado do medicamento, uma vez que estes são a ponte entre o utente e o medicamento. Assim sendo, a Farmácia Vitória conta com a colaboração de 8 profissionais todos eles identificados com um cartão com o seu nome e o respetivo título profissional (2). O quadro

técnico é composto pela Diretora Técnica, uma farmacêutica substituta, quatro farmacêuticos e dois técnicos superiores de saúde.

De modo a disponibilizar outros serviços aos utentes da Farmácia Vitória, a equipa conta também com a colaboração de duas nutricionistas e uma podologista. Com estes colaboradores cooperam também uma auxiliar de limpeza e um contabilista.

2.4. Recursos informáticos

No que diz respeito ao sistema informático, todos os computadores da referida farmácia estão equipados com o SIFARMA 2000, no entanto, e ainda numa fase de experiência piloto, os colaboradores podem também utilizar o novo SIFARMA.

Estes sistemas informáticos são rotineiramente utilizados em todas as fases do circuito do medicamento desde a entrada na farmácia até à dispensa ao utente, passando pela gestão de *stocks* e de prazos de validade, registo de devoluções, encomendas ao fornecedor e etiquetagem dos produtos de venda livre, entre outras funcionalidades.

Durante o estágio compreendi que o SIFARMA 2000 representa uma ferramenta fundamental e indispensável ao bom funcionamento da farmácia. Contribui para um melhor desempenho dos seus profissionais, o que se traduz numa maior segurança na dispensa, uma vez que obriga a uma dupla verificação da medicação cedida, bem como no aconselhamento do medicamento ao utente, pois disponibiliza informações científicas úteis no ato da dispensa. Este sistema também permite o acompanhamento do histórico do utente com a criação de fichas do utente e, conseqüentemente, facilita a deteção de contra-indicações reduzindo, assim, possíveis interações medicamentosas e erros associados à dispensa de medicamentos.

3. Informação e documentação científica

As farmácias são encaradas, pela maioria dos utentes, como estabelecimentos de saúde a que podem recorrer para resolução de situações de saúde consideradas menores. Por este motivo, é imperativo capacitar todos os colaboradores das farmácias para a correta resolução dos problemas dos utentes através de um adequado aconselhamento farmacêutico.

Consultar documentação científica é essencial para o farmacêutico se manter atualizado das novas informações acerca dos medicamentos e outros produtos de saúde e bem-estar, além de contribuir para um aconselhamento cientificamente rigoroso e consolidado. Com isto, o farmacêutico torna-se capaz de esclarecer todas as suas dúvidas e também as dos utentes

em relação aos medicamentos ou produtos de saúde e bem-estar, tendo por objetivo alcançar os melhores resultados em saúde de todos os cidadãos.

A biblioteca da Farmácia Vitória dispõe de um conjunto de documentos essenciais aos farmacêuticos, tais como Farmacopeia Portuguesa, sendo esta de carácter obrigatório em todas as farmácias, Prontuário Terapêutico, Formulário Galénico Português, Manual das Boas Práticas em Farmácia Comunitária, Índice Merck, Dicionários de Termos Médicos, Direito Farmacêutico, Simposium Terapêutico e o Índice Nacional Terapêutico.

Além desta literatura física, estão disponíveis documentações online através do Centro de Informação do Medicamento e Intervenções em Saúde (CEDIME) da Associação Nacional das Farmácias (ANF) e o Centro de Informação do Medicamento (CIM). Também é possível contactar estes centros por via telefónica para o esclarecimento de dúvidas. Consultando os sítios da internet da ANFonline e do INFARMED, é possível encontrar vários tipos de publicações legislativas e científicas tais como circulares, *newsletters*, notícias mais recentes, características dos medicamentos entre outras informações de carácter legislativo/científico. Adicionalmente, e através do iSaúde do SIFARMA também é possível encontrar diversas informações científicas que complementam o atendimento e que podem ser disponibilizadas aos utentes.

Em virtude de uma reacção adversa a um medicamento (descrita no tópico 9) desenvolvida por uma utente contactei telefonicamente o CEDIME para me esclarecer algumas dúvidas acerca das manifestações adversas do medicamento e transmitir as informações à utente.

Outra forma de atualizar os conhecimentos científicos é através dos delegados de saúde. Estes transmitem não só informações úteis para um melhor aconselhamento dos utentes, como as vantagens e desvantagens do medicamento representado por eles comparativamente a outro.

No entanto, sempre que chegam documentos à farmácia, quer seja via e-mail, carta ou fax, estes são analisados, comunicados à equipa e, posteriormente, arquivados.

4. Aprovisionamento e armazenamento

Atualmente, devido à enorme quantidade e diversidade de produtos de saúde e medicamentos disponíveis no mercado, a gestão do *stock* da farmácia tornou-se uma atividade essencial para a rentabilização da mesma e para o seu bom funcionamento. É nesta secção que o farmacêutico tem de ter uma boa capacidade de gerir os recursos disponíveis para satisfazer, da melhor forma possível, as necessidades dos seus utentes.

Assim, a otimização do *stock* dos produtos disponíveis na farmácia torna-se uma mais valia no aprovisionamento e armazenamento dos mesmos e deve-se ter em conta a sazonalidade e a rotatividade dos produtos, tentando minimizar o volume do *stock* e reduzir as ruturas do mesmo. Nesta secção, o sistema informático SIFARMA 2000 desempenha funções importantes, uma vez que permite criar fichas dos produtos nas quais se insere o seu *stock* mínimo e máximo. Quando se verifica uma diminuição do *stock* de um determinado produto, o SIFARMA 2000 propõe automaticamente uma encomenda de forma a repor os níveis pré-definidos.

O meu estágio iniciou-se nesta secção, na qual comecei por ajudar na receção de medicamentos e produtos de saúde. Com esta tarefa consegui também familiarizar-me com o sistema informático e com os nomes comerciais de alguns dos medicamentos que até então desconhecia.

4.1 Seleção de um fornecedor

De forma a garantir o *stock* dos medicamentos e produtos de saúde disponíveis na farmácia, os fornecedores encarregam-se de fazer a entrega dos mesmos. Para seleccionar um fornecedor em detrimento de outro é necessário ter em consideração diversos aspetos, nomeadamente os preços de venda e descontos associados, as horas de entrega, a possibilidade de devoluções e condições comerciais. Posto isto, a farmácia Vitória associou-se a um grupo de compras, o Grupo Única, que é composto por mais de 120 farmácias. Através dele estabelecem-se parcerias entre as farmácias e a indústria farmacêutica para se conseguir melhores condições nas compras e otimizar os custos. Desta forma, tenta-se combater as dificuldades económicas vividas pelo setor e potenciar a rentabilidade das farmácias.

O SIFARMA 2000 assinala e destaca os produtos pertencentes ao grupo durante a dispensa dos mesmos, o que permite fazer opções de dispensa mais rentáveis para a farmácia.

Numa primeira fase do estágio, a Farmácia Vitória estabelecia parcerias com a Alliance Healthcare, a Plural e com a Udifar. O principal fornecedor desta farmácia é a Plural que fazia três entregas diárias às 9h30, 14h00 e 19h45. A Udifar fazia entrega de produtos às 9h00 e às 16h30, e a Alliance Healthcare procedia à entrega às 09h00, às 13h40 e às 18h25. O facto de estes fornecedores fazerem entregas mais do que uma vez por dia possibilita que os medicamentos em falta sejam repostos no próprio dia e permite que os stocks dos produtos sejam mais reduzidos.

Em caso de rutura de *stock* e urgência em obter um determinado medicamento por um utente, os farmacêuticos podem contactar com outras farmácias do município para saber se alguma delas tem *stock* disponível para satisfazer a necessidade do mesmo.

Contudo, o número de encomendas rececionadas durante e após o período de estado de emergência também foi alterado. Inicialmente cada fornecedor encarregava-se de entregar as encomendas uma vez por dia. Atualmente as encomendas são rececionadas de manhã e às 14h. Além disso, a Udifar deixou de operar no mercado de entregas dos medicamentos, ficando a Farmácia Vitória com 2 fornecedores: Plural e Alliance Healthcare.

4.2 Encomendas

As encomendas são realizadas através do SIFARMA 2000 entre duas a três vezes por dia consoante o fornecedor. Também existem diversos tipos de encomendas: diárias, instantâneas, encomendas por via verde e diretas.

As **encomendas diárias** são geradas automaticamente pelo SIFARMA 2000 com base nos *stocks* máximo e mínimo de cada produto e no armazenista preferencial. Sempre que o stock atinge o mínimo ou menos, o sistema propõe uma encomenda de forma a repor o *stock* máximo. Antes de ser enviada ao fornecedor, esta encomenda é verificada e atualizada, se necessário, por um elemento da equipa responsável por esta tarefa.

As **encomendas instantâneas** são realizadas normalmente durante o atendimento e servem, principalmente, para superar a falta de um produto momentaneamente na farmácia ou para encomendar um produto que, normalmente, não apresenta *stock* na farmácia. Este tipo de encomendas é útil para satisfazer as necessidades dos utentes. Após a seleção do fornecedor, é possível indicar ao utente a data prevista de entrega do produto e o respetivo preço.

As **encomendas por via verde** são um mecanismo excecional para abastecer as farmácias em relação a alguns medicamentos específicos quando estes estão em situação de rutura. Habitualmente, são realizadas no ato da dispensa e na presença de uma receita médica, uma vez que este último critério é o requisito obrigatório para a entrega do medicamento à farmácia em detrimento de outros tipos de encomendas.

As **encomendas diretas** são feitas diretamente ao fabricante. Com base nas suas notas de encomenda insere-se manualmente todos os produtos no sistema informático.

Para além das encomendas acima mencionadas, os produtos necessários podem ser encomendados por via telefónica ou via e-mail, principalmente para fornecedores que não aceitam encomendas pelo sistema informático, como é o caso específico da Beiravet®, um

fornecer de produtos veterinários. Posteriormente, são arquivadas as notas de encomenda até à entrega do produto. Durante o estágio, tive a oportunidade de contactar e rececionar todos os tipos de encomendas.

4.2.1 Receção de encomendas

Assim que as encomendas chegam à farmácia, é necessário proceder à sua receção, ou seja, introduzir todos os produtos no SIFARMA 2000 para que possam estar disponíveis para dispensa. Por norma, a acompanhar as encomendas vêm sempre as faturas, em duplicado, para que seja possível confirmar os produtos rececionados. Nestas faturas constam sempre os dados do fornecedor e da farmácia (nomeadamente nome, morada e número de contribuinte), o número de encomenda e o respetivo código, designação de cada produto enviado, o código nacional do produto (CNP), data de validade, quantidade encomendada e fornecida, preço de venda ao público (PVP) (quando se tratam de MSRM), preço de venda à farmácia (PVF), imposto sobre o valor acrescentado (IVA), preço líquido por unidade, número total de embalagens e o valor total da fatura.

O passo inicial da receção das encomendas, após se seleccionar o fornecedor e a referência da fatura, é introduzir o número da mesma e o valor total. No entanto, para encomendas que sejam feitas diretamente ao delegado de informação médica ou por contacto telefónico é necessário criar manualmente a encomenda no SIFARMA 2000, na secção “Gestão de Encomendas” para que se possa rececionar de igual forma. Posteriormente, lê-se o CNP, código bidimensional “datamatrix”, ou o código de barras do produto através de um leitor ótico, verifica-se o estado de conservação, a data de validade, a quantidade fornecida, o PVP e o PVF. Neste ponto, dá-se prioridades aos produtos refrigerados. Estes são os primeiros a ser conferidos para se armazenar o mais rapidamente possível no frigorífico. Após todas estas verificações em todos os produtos rececionados, o montante final a pagar ao fornecedor e o número de unidades devem coincidir com os apresentados pela fatura. Quando se finaliza a receção da encomenda é possível transferir para outro fornecedor os produtos que estavam encomendados e não foram enviados para a farmácia.

Os MNSRM não apresentam PVP na fatura nem nas embalagens, uma vez que o preço de venda vai ser calculado com base no PVF, no IVA (6 ou 23%) e nas margens de comercialização da farmácia. Depois de determinar o PVP, os MNSRM são etiquetados.

Terminada a receção das encomendas, os produtos são transportados em caixas para serem armazenados no devido lugar.

4.2.2 Devolução de produtos

Para se proceder a uma devolução de um produto podem ocorrer diversas situações: embalagem danificada, erro no pedido ou no envio, prazo de validade expirado, produto retirado do mercado, entre outras situações. No sistema é necessário introduzir o fornecedor, a designação do produto, o motivo de devolução e o número da fatura de compra. Para completar esta informação também se pode adicionar uma nota ao fornecedor solicitando o modo, preferencial, de como a farmácia quer ser reembolsada (substituição do produto ou crédito), quando possível.

As devoluções de medicamentos e de produtos de saúde são registadas no sistema informático, nomeadamente na parte de “Gestão de Devoluções” para que seja emitida a nota de devolução em triplicado. Assim, o original e o duplicado são carimbados e assinados pelo membro da equipa que procedeu à devolução e seguem juntamente com o produto até ao fornecedor. O triplicado é assinado pelo estafeta que faz a sua recolha e é arquivado na farmácia (anexo I).

Nas situações em que a devolução é aceite, os fornecedores repõem o produto nas condições corretas ou criam uma nota de crédito. Com qualquer um destes elementos procede-se à regularização da nota de devolução no sistema informático da farmácia. Pelo contrário, quando a devolução não é aceite, o fornecedor indica o motivo e volta a enviar o produto para a farmácia nas mesmas condições.

4.3 Armazenamento

Após a receção das encomendas, é necessário arrumar todos os produtos no devido lugar. Para isso, estes são transportados em caixas próprias até ao armazém principal e depois armazenados nos respetivos lugares, tendo subjacente os princípios “FEFO”, “*first expire, first out*” para medicamentos com data de validade e “FIFO”, “*first in, first out*” para aqueles que não apresentam data de validade. Estes princípios contribuem para um melhor e mais eficaz escoamento dos produtos, evitando que fiquem retidos demasiado tempo na farmácia. Desta forma, os MSRM são agrupados por ordem alfabética e por formas farmacêuticas: comprimidos/cápsulas, injetáveis não termolábeis, pomadas/cremes, supositórios, produtos oftálmicos e xaropes. Estes são armazenados num armário com gavetas deslizantes enquanto que outros produtos de saúde como suplementos alimentares, gotas orais, dispositivos de inalação e formas farmacêuticas de uso externo estão distribuídos por prateleiras. Os MNSRM com maior rotatividade encontram-se em gavetas atrás dos balcões de atendimento (ver secção 2.2.2). Os produtos termolábeis são armazenados num frigorífico, cuja temperatura varia entre os 2°C e os 8°C, de forma a

garantir a correta conservação e estabilidade de acordo com as indicações do fabricante. Quanto aos medicamentos psicotrópicos, estes encontram-se guardados num cofre de dupla fechadura.

No que se refere às condições de armazenamento e conservação dos medicamentos, no geral estes devem ser conservados a uma temperatura entre os 15°C e os 25°C e uma humidade relativa inferior a 60%, exceto os produtos termolábeis. De forma a assegurar as corretas condições de conservação, estes parâmetros são monitorizados e registados duas vezes por dia em todas as divisões da farmácia onde possam estar guardados medicamentos ou outros produtos de saúde. Esta situação implica a existência de termo-higrómetros calibrados nas diferentes divisões e no frigorífico. Estes equipamentos são analisados e calibrados pelas entidades competentes anualmente, assim como o esfigmomanómetro e as balanças do laboratório. Quanto ao termo-higrómetro do frio este regista automaticamente as temperaturas ao longo do dia.

Durante o estágio, aprendi a armazenar corretamente os diferentes medicamentos o que contribuiu para uma melhor compreensão do quão importante é a correta organização e gestão dos stocks para obter os maiores benefícios não só para o utente que está a ser atendido, mas também para o bom funcionamento da farmácia. Além disso, foi-me delegada a função de verificar e registar os valores de temperatura e de humidade diariamente.

4.4 Controlo dos prazos de validade

Nesta farmácia os prazos de validade são controlados principalmente em três fases distintas: aquando da receção da encomenda, mensalmente e durante o atendimento. É necessário garantir um rigoroso controlo dos prazos de validade, não só para não ser dispensado nenhum produto fora de validade, como para assegurar a estabilidade do mesmo. Como ferramenta de auxiliar neste controlo de validade, o SIFARMA 2000 permite emitir uma listagem de todos esses produtos.

Assim, na Farmácia Vitoria, é emitida uma listagem dos produtos cujos prazo de validade é reduzido. Nesta lista vem indicado o código do produto, a designação, o *stock*, o prazo de validade (mês e ano) e ainda uma linha para corrigir a data de validade, caso esta esteja incorreta. Esta política permite recolher atempadamente os medicamentos e outros produtos com validade a expirar e, simultaneamente, detetar eventuais erros de stock.

Após a verificação completa da listagem, pode-se assinalar estes medicamentos como prioritários e colocá-los numa secção própria para poderem ser escoados atempadamente. Tendo por base o regime posológico do utente, pode ser possível ceder estes medicamentos em detrimento de outros com maior prazo de validade. Nestes casos, é necessário garantir

que o prazo de validade nunca é ultrapassado. Caso esta situação não seja possível, deve-se proceder à devolução dos produtos ao fornecedor correspondente.

Durante o estágio, verifiquei as validades dos diferentes produtos, o que me permitiu familiarizar com a localização de muitos MNSRM e outros produtos de saúde, bem como saber que produtos de dermocosmética, ortopedia, puericultura estão disponíveis na farmácia.

5. Dispensa de medicamentos

Os farmacêuticos, como agentes de saúde, têm como “primeira e principal responsabilidade a saúde e o bem-estar do doente e do cidadão em geral” (4). A dispensa de medicamentos é considerada uma tarefa de extrema relevância, na qual o farmacêutico é responsável, após avaliar toda a medicação, por ceder medicamentos ou substâncias medicamentosas aos doentes independentemente do medicamento ser sujeito ou não a receita médica (1). Durante este ato, é necessário promover o uso racional do medicamento, garantir que a medicação a ser dispensada é segura e que é acompanhada por toda informação, verbal e escrita, necessária ao seu correto uso. Neste ponto, é necessário também que o farmacêutico saiba adequar o seu discurso consoante o utente que está a atender. Existem diversas formas para facilitar a relação farmacêutico-utente-medicamento de modo a que a informação que se quer transmitir seja compreendida pelo utente. Esta abordagem poderá ser feita através de etiquetas com a descrição da posologia, etiquetas com pictogramas, folhetos informativos, via e-mail e mensagens por telemóvel.

5.1 Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

Os medicamentos são sujeitos a receita médica (MSRM) sempre que seja necessária a vigilância médica durante o tratamento por constituírem um risco para a saúde do doente/utente, sejam utilizados para fins distintos àqueles a que se destinam, contenham substâncias ou preparações à base dessas substâncias que necessitam de ser monitorizadas devido à sua atividade ou aos seus efeitos adversos, ou quando se destinam a ser administrados por via parentérica (4).

Os MSRM são dispensados exclusivamente pelas equipas das farmácias mediante a apresentação da prescrição médica emitida por profissionais devidamente habilitados. O farmacêutico deve fazer a avaliação farmacoterapêutica dessa receita e verificar se todos os itens exigidos na validação da mesma estão corretos. Na prescrição de um medicamento constam obrigatoriamente a respetiva Denominação Comum Internacional (DCI) da

substância ativa, a forma farmacêutica, a dosagem, a apresentação (número de unidades da forma farmacêutica), a quantidade (nº de embalagens) e a posologia (5,6).

Por outro lado, a prescrição de medicamentos pode ser realizada por Denominação Comercial do Medicamento, excepcionalmente, quando não exista medicamento genérico ou quando este não seja compartilhado ou perante justificações técnicas assinaladas pelo prescriptor tais como (5):

- Para medicamentos cujo índice terapêutico é estreito, indicando na receita “Exceção a) do nº 3 do artigo 6º” da Portaria nº224/2015;
- Suspeita fundamentada de reação adversa prévia, indicando na receita “Exceção b) do nº 3 do artigo 6º” da Portaria nº224/2015;
- Em situações de continuidade de tratamento superior a 28 dias, indicando na receita “Exceção c) do nº 3 do artigo 6º” da Portaria nº224/2015”.

Atualmente, estão em vigor dois tipos de prescrições médicas: manual e eletrónica.

A prescrição manual é uma receita materializada em papel e manuscrita pelo prescriptor, no entanto este tipo de prescrição passou a ser de carácter excepcional. Em caso de falência do sistema informático, inadaptação fundamentada do prescriptor, prescrição ao domicílio, ou outras situações, até um máximo de 40 receitas por mês são as exceções aceites por lei para realizar a prescrição por via manual (5).

Para que a receita seja validada pelo farmacêutico, aquando da dispensa, é obrigatório constar assinalada a respetiva exceção que levou o prescriptor a utilizar este tipo de receita. As receitas manuais são válidas apenas por 30 dias após a data da sua emissão e em cada uma podem constar no máximo 4 medicamentos diferentes, ou 2 embalagens por medicamento, nunca ultrapassando as 4 embalagens por receita. No entanto, esta regra de prescrição não abrange os medicamentos em dose unitária, podendo ser prescritas até 4 embalagens (6). Além destes requisitos, é necessário verificar outros parâmetros, tais como:

- Número da receita
- Vinheta identificativa do local de prescrição, ou respetivo código, se aplicável;
- Vinheta identificativa do médico prescriptor;
- Assinatura do médico prescriptor;
- Identificação da especialidade médica, se aplicável;
- Contacto telefónico do prescriptor, se aplicável;
- Nome e número de utente;

- Referência ao regime especial de comparticipação de medicamentos. No SNS podem estar representados pela letra “R” caso sejam pensionistas abrangidos por este regime ou pela letra “O” quando sejam abrangidos por outro regime especial de comparticipação
- Número de beneficiário da entidade financeira responsável, se aplicável;
- Duração do tratamento

Por sua vez, a prescrição médica eletrónica subdivide-se em prescrição materializada, a qual é impressa no momento de prescrição, e em prescrição desmaterializada, sem papel e na qual é emitida uma guia de tratamento para o utente (6). As primeiras podem ser renovadas contendo até três vias que vigoram, também, por seis meses. As receitas desmaterializadas vigoram, no máximo por 6 meses e em cada linha de prescrição podem constar até duas embalagens de cada medicamento ou produto de saúde, exceto em casos de tratamentos prolongados que podem ser prescritas até seis embalagens por linha (6).

Têm sido feitos esforços no sentido de privilegiar a desmaterialização das receitas médicas, uma vez que estas representam um processo mais eficaz e seguro não só no controlo da emissão das mesmas, mas, também, na dispensa da medicação. Este modelo eletrónico apresenta vantagens para o utente na medida em que se disponibiliza a receita através de uma mensagem no telemóvel, e-mail ou através da impressão da guia de tratamento. Uma mesma receita pode conter MSRM, MNSRM ou produtos de saúde, podendo o utente optar pela sua aquisição total ou parcial em diferentes atos de dispensa. Nas receitas manuais ou materializadas esta opção não é válida.

Aquando da dispensa de medicamentos com receita médica manual ou eletrónica materializada, é necessário imprimir no verso da receita o número de registo dos medicamentos, quantidade dispensada, preço de cada medicamento, valor total da receita, encargo do doente, comparticipação do estado, incentivo, preço de referência e data de dispensa. O utente deve assinar a receita no fim da dispensa como forma de confirmação da dispensa dos medicamentos. Adicionalmente, o elemento da equipa da farmácia responsável pela dispensa deve carimbar, datar e assinar a mesma.

5.2 Medicamentos Sujeitos a Receita Médica em Urgência

Os medicamentos sujeitos a receita médica só são dispensados mediante a apresentação da mesma. Em casos de urgência, os MSRM podem ser dispensados ao utente sem prescrição médica se a falta dos mesmos constituir um risco de vida para o utente. Além disso, antes da dispensa, o farmacêutico tem que se certificar que conhece o perfil farmacoterapêutico

do utente e assegurar-se que o medicamento, a forma farmacêutica e a dosagem são os corretos, recorrendo à ficha de utente guardada no SIFARMA 2000. Mais tarde, o utente terá de entregar a receita médica à farmácia para se poder regularizar a dispensa.

5.3 Medicamentos Psicotrópicos/Estupefacientes

Os medicamentos psicotrópicos e estupefacientes são um grupo de medicamentos que estão sob controlo bastante rigoroso por parte do INFARMED, I.P. Apesar de apresentarem propriedades benéficas para o sistema nervoso central, estas substâncias são capazes de induzir habituação e dependência, quer física quer psíquica, estando por isso associados, muitas vezes, a atos ilícitos. De modo a combater esses atos e controlar todo o circuito do medicamento, os psicotrópicos e estupefacientes são abrangidos por uma legislação específica com regras especiais de prescrição, dispensa e faturação (4).

Estas substâncias apenas podem ser cedidas com prescrição médica e incluem-se na receita médica especial. Se a prescrição for materializada ou manual, não pode conter outros medicamentos ou produtos de saúde. Por outro lado, esta limitação não se verifica se a prescrição for desmaterializada, no entanto, não podem ser dispensadas mais de 6 embalagens (5).

Durante a dispensa de substâncias classificadas como psicotrópicos ou estupefacientes é necessário ter cuidados acrescidos. O sistema informático além de emitir um alerta com o símbolo “PSI”, requer detalhadamente a identificação do requerente (independentemente se é o utente a quem foi prescrito ou não): nome, data de nascimento, número de cartão de cidadão (ou outro igualmente válido como passaporte ou carta de condução), validade do mesmo e a morada. Em caso de falência do sistema informático não é permitida a dispensa deste tipo de medicamentos (5).

Terminada a dispensa, é emitido um Documento de Psicotrópicos onde consta a informação anterior, o número de registo de saída do psicotrópico e o operador que efetuou a dispensa. Este talão deve ser assinado pelo utente (ou o seu representante) e arquivado, obrigatoriamente, na farmácia durante, pelo menos, três anos. Caso se trate de receitas manuais ou eletrónicas materializadas é necessário arquivar o talão juntamente com a fotocópia da receita.

Conforme o legislado, a farmácia deve enviar ao INFARMED, I.P, todas as listas de saída dos medicamentos juntamente com as fotocópias das receitas manuais com medicamentos dispensados contendo uma substância classificada como estupefaciente ou psicotrópica até ao dia 8 do mês seguinte (5). Para tal, na farmácia é nomeado um elemento da equipa responsável pela preparação, emissão e análise das listas de entrada e saída dos

psicotrópicos e estupefacientes. As primeiras listas são verificadas mensalmente e devem coincidir com as listas enviadas pelos fornecedores aos quais se comprou o medicamento. Uma vez por ano, é enviado para a mesma entidade o balanço anual de entradas e saídas dos psicotrópicos.

No decorrer do estágio curricular, tive a oportunidade de dispensar alguns medicamentos sujeitos a receita médica especial.

5.4 Medicamentos Genéricos

Os medicamentos genéricos caracterizam-se por apresentarem a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e apresentam estudos de biodisponibilidade que demonstram a bioequivalência com o medicamento de referência (4).

Segundo a legislação, a farmácia deve dispor de, pelo menos, três medicamentos genéricos de entre os cinco mais baratos de cada grupo homogêneo (5).

Aquando da dispensa, o farmacêutico deve alertar o utente para a existência de medicamentos genéricos, remetendo a escolha entre medicamento de marca ou genérico ao critério do utente. Se este optar pelo genérico, recomenda-se a dispensa do medicamento mais económico (5).

5.5 Regimes de Participação

Atualmente, grande parte dos medicamentos sujeitos a receita médica estão abrangidos por regimes de participação. Isto significa que o utente paga apenas uma percentagem do PVP, enquanto que o restante é pago pelo organismo de participação. Em Portugal, os medicamentos, dispositivos médicos ou outros produtos de saúde podem ser participados através de um regime geral ou de um regime especial (6).

No regime geral de participação, é o estado português que se encarrega de pagar a participação. Neste caso, o valor pago pelo beneficiário varia de medicamento para medicamento e depende do escalão de participação associado. Os quatro escalões de participação, A B C e D, variam consoante a classificação farmacoterapêutica do medicamento e estão definidos na Portaria nº195-D/2015 de 30 de junho (7).

O regime especial de participação está reservado para determinadas patologias ou grupos de doentes como a lúpus e materiais para ostomizados. Cada regime excepcional está associado a um diploma que deve ser mencionado na receita médica para garantir a percentagem da participação especial.

Adicionalmente a estes regimes, existem subsistemas que contribuem com uma comparticipação extra nos medicamentos. Nestas situações para que a farmácia seja reembolsada, é necessário guardar o número de beneficiário do respetivo subsistema para, posteriormente, serem enviadas às diferentes entidades.

Durante o estágio tive contacto com ambos os regimes, no entanto as comparticipações mais comuns no regime geral são feitas pelo SNS, representado pelo organismo 01, enquanto que as comparticipações especiais mais frequentes na Farmácia Vitória são feitas pelo plano SNS-Pensionista, representado pelo organismo 48. Foi possível contactar com outros regimes e subsistemas de comparticipação nomeadamente regimes direcionados com a doença de Lúpus e da diabetes (DS-SNS) e o subsistema do Serviço de Assistência Médico Social do Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas, representado por SAMS, Caixa Geral de Depósitos (CGD), entre outros. Estes planos encontram-se atualizados no SIFARMA 2000, o que ajuda na diminuição de erros associados à comparticipação.

5.6 Dispensa de Produtos de saúde ao abrigo de um protocolo

Com base nos regimes de comparticipação em vigor em Portugal, há produtos de saúde para certos doentes que podem ser dispensados ao abrigo de um protocolo. Durante o estágio, tive a oportunidade de contactar com este tipo de dispensa em dispositivos médicos para automonitorização da Diabetes Mellitus

Para os utentes diabéticos, as tiras-teste, agulhas, seringas e lancetas destinadas ao controlo da patologia são abrangidas por um regime de comparticipação do Estado, desde que apresentem receita médica. Este protocolo destina-se a utentes do SNS e de outros subsistemas públicos garantindo a comparticipação de 85% do PVP das tiras-teste e de 100% dos outros dispositivos mencionados, no entanto para serem incluídos neste regime não podem ultrapassar um valor máximo de PVP estipulado (8,9).

6. Automedicação vs Dispensa por Indicação Farmacêutica

6.1 Dispensa de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

Os Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica são todos aqueles que não se enquadram nos requisitos dos MSRM (citados no ponto 5.1) (4). Este tipo de medicamento apenas deve ser cedido para aliviar ou resolver problemas de saúde de carácter não grave, autolimitantes e de curta duração. Dentro destes, encontram-se ainda os MNSRM Dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF).

Depois de avaliar a condição de saúde de cada utente, o farmacêutico pode concluir que os sintomas manifestados podem estar relacionados com patologias mais graves, ou, pode surgir um diagnóstico mais dúbio da condição do utente. Nestes casos, o mais indicado é encaminhar o utente ao médico, sem dispensar qualquer medicação.

Os MNSRM podem ser cedidos em regime de automedicação ou por indicação farmacêutica. No primeiro caso, é o utente que deteta o problema de saúde e instaura um tratamento medicamentoso por vontade própria (1). Perante esta situação, o farmacêutico tem ainda um papel mais crucial na interação farmacêutico-utente-medicamento devendo estabelecer uma adequada comunicação com o utente de forma a recolher informações acerca do problema de saúde que o afeta, há quanto tempo persistem os sintomas, se já se automedicou com outra medicação, existência de patologias concomitantes e a terapêutica atual. Todos estes elementos são pertinentes no sentido de se oferecer a melhor solução para a saúde do utente e de se transformar a automedicação em indicação farmacêutica. Posteriormente, deve orientar a utilização ou não do respetivo medicamento adicionando informações simples, claras e compreensíveis, de modo a estimular o uso racional do medicamento.

Quanto à cedência de medicamentos por indicação farmacêutica, é o farmacêutico que se responsabiliza por selecionar e aconselhar o MNSRM que mais se adequa para tentar solucionar um determinado problema de saúde do utente.

Em ambas as situações, o farmacêutico deve recolher toda a informação que considere fundamental para uma correta intervenção. Recomenda-se que o utente seja informado acerca da dose, frequência e modo de administração, duração do tratamento e precauções de utilização. É também importante alertar o utente para possíveis efeitos adversos que possam surgir durante a terapêutica. Para potenciar os efeitos benéficos, o farmacêutico pode ainda aconselhar medidas não farmacológicas complementares ou outros serviços de saúde e o acompanhamento da situação, sugerindo ao doente que volte uns dias mais tarde à farmácia para se avaliar novamente o problema de saúde.

7. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde

A Farmácia Vitória dispõe de uma variada gama de produtos de saúde disponíveis para os seus utentes, desde a área de dermocosmética, à fitoterapia e suplementos nutricionais, incluindo produtos dietéticos e dispositivos médicos, que podem contribuir para melhorar o bem-estar dos utentes. Neste ramo, é essencial que o farmacêutico saiba realizar um aconselhamento apropriado, mantendo-se atualizado sobre as novas tendências, de modo a que o utente retire o melhor proveito deste tipo de produtos.

idosos com dificuldades na mastigação de alimentos, doentes com disfagia ou pessoas que vão fazer a preparação para uma colonoscopia que mais procuram este tipo de produtos. Dentro desta gama, encontramos diversas marcas tais como Fortimel®, Meritene® e Resource®.

7.3 Medicamentos fitoterapêuticos e suplementos nutricionais

Medicamentos fitoterapêuticos ou à base de plantas são medicamentos que apresentam propriedades terapêuticas provenientes de uma ou mais substâncias ativas de plantas ou dos seus derivados (4).

No que diz respeito aos suplementos alimentares, tal como o nome indica, complementam ou suplementam o regime alimentar, contribuindo para um maior aporte de nutrientes ou de outras substâncias com efeito fisiológico ou nutricional (11). Dentro destes destacam-se três grandes grupos: vitaminas e minerais, plantas e extratos botânicos e outras substâncias (11). É de salientar que estes produtos são regulados pela Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), um organismo diferente da regulação dos medicamentos.

Neste contexto, é essencial lembrar o utente que estes produtos apesar de serem naturais não estão desprovidos de efeitos adversos nem de interações medicamentosas. Portanto, é importante que o farmacêutico aconselhe a fitoterapia ou os suplementos nutricionais mais adequados a cada situação após avaliar a medicação do utente em causa.

7.4 Medicamentos de uso veterinário

Este tipo de medicamento caracteriza-se por exercer uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, com vista a restaurar, corrigir ou modificar as funções fisiológicas, apresenta propriedades curativas ou preventivas de doenças, ou dos seus sintomas em animais. Também podem ser utilizados para estabelecer um diagnóstico médico-veterinário (12). Em semelhança com os suplementos alimentares, os medicamentos de uso veterinário são igualmente regulados pela DGAV.

A farmácia dispõe de uma zona facilmente identificável por “Espaço Animal” com diversos produtos de uso veterinário. O Espaço Animal é um serviço exclusivo das farmácias aderentes que permite ter à sua disposição um veterinário para esclarecer dúvidas e auxiliar no aconselhamento ao utente. Desta forma, o utente recebe gratuitamente o aconselhamento veterinário mais indicado por intermédio do farmacêutico. Este é um serviço de extrema relevância, pois permite que farmacêuticos transmitam informações com maior rigor e segurança, uma vez que não apresentam uma elevada formação académica na área de saúde e bem-estar animal.

Durante o estágio li algumas das fichas de aconselhamento do Espaço Animal, que me ajudaram bastante no correto aconselhamento de diversos medicamentos de uso veterinário, nomeadamente os desparasitantes internos e externos para cães e gatos, que são os mais procurados nas farmácias. Aquando do aconselhamento da desparasitação é crucial abordar medidas de higiene destes animais para promover o bem-estar e a saúde dos mesmos.

Os principais produtos cedidos são essencialmente desparasitantes dentro dos quais destaco os que mais contactei: Simparica® (externo) Milbemax® (interno) em comprimidos, Frontline® em pipetas e Scalibor® em coleiras. Todos estes têm indicação de posologia dependendo do peso do animal. Recentemente, surgiram os produtos Patta® que contém suplementos alimentares e diversos produtos para manter a saúde dos animais.

Durante este período também dispensei alguns MSRM e MNSRM de uso humano através de receitas de medicina veterinária apresentando dois exemplos em anexo (anexos II e III).

7.5 Dispositivos médicos

Os dispositivos médicos foram desenvolvidos com o intuito de prevenir, diagnosticar, tratar, atenuar ou controlar uma doença, deficiência ou uma lesão nos seres humanos. Também se incluem neste grupo quaisquer instrumentos, aparelhos, equipamentos, softwares, materiais ou artigos utilizados isoladamente ou em combinação para o controlo da conceção, estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico (13).

Assim sendo, a sua definição abrange um vasto conjunto de produtos cuja finalidade é comum à dos medicamentos, porém, atingem os seus objetivos mediante mecanismos distintos (13). Estes encontram-se subdivididos em 4 classes distintas (I, IIa, IIb, III) consoante o fim a que se destinam, risco inerente à conceção e fabrico, anatomia, invasibilidade e duração do contacto com o corpo humano.

Os dispositivos médicos que mais contactei ao longo do estágio foram termómetros, luvas e máscaras cirúrgicas, principalmente, devido à crise de saúde pública causada pelo COVID-19 (novo Coronavírus identificado pela primeira vez no final do ano transato na China). Além destes, também tive a oportunidade de dispensar joalheiras elásticas, meias de compressão, seringas, compressas, lancetas, testes de gravidez, entre outros.

8. Preparação de medicamentos

Apesar de ser uma prática cada vez menos comum no âmbito da farmácia comunitária, por vezes é necessário preparar medicamentos manipulados como forma de combater algumas lacunas dos medicamentos, quer seja pela inexistência da dosagem adequada ao utente,

quer seja pela necessidade de ajustar a forma de administração ao utente em causa ou pela carência da substância ativa na forma farmacêutica pretendida. Esta prática está a cargo do farmacêutico diretor-técnico ou do farmacêutico-adjunto. Assim, os medicamentos manipulados representam uma área de intervenção do farmacêutico, permitindo responder às necessidades específicas dos utentes. A dispensa deste tipo de medicamentos pode ser com receita médica ou não.

Posto isto, os medicamentos manipulados podem ser agrupados em:

- Fórmulas Magistrais, quando são preparados segundo uma receita médica destinada a um determinado doente;
- Preparados oficiais, quando são preparados a partir de uma fonte de documentação científica válida, como a Farmacopeia Portuguesa ou o Formulário Galénico Português, por exemplo (14).

Antes de proceder à preparação de qualquer medicamento manipulado e na presença de prescrição médica manual o farmacêutico deve-se certificar que a mesma contém pelo menos um dos seguintes termos “Manipulado” ou F.S.A (Faça Segundo a Arte), que está adequada ao perfil fisiopatológico do doente e que não existe risco de interações nem de contraindicações.

Tendo por base as boas práticas farmacêuticas e as boas práticas de preparação de medicamentos manipulados, é imperativo garantir a qualidade e segurança do mesmo. Para tal, é necessário estabelecer procedimentos gerais e específicos, nomeadamente através do preenchimento das fichas de preparação dos manipulados nas quais se indicam as matérias primas, o lote correspondente, todas as operações efetuadas e se registam as verificações de qualidade efetuados de forma a se poder reconstituir o histórico de cada preparação. Estas fichas devem ser guardadas no mínimo durante três anos na farmácia (14).

As matérias primas utilizadas na preparação dos manipulados encontram-se acondicionadas em recipientes adequados, rotulados e devidamente armazenadas consoante as suas especificações. Juntamente com as matérias primas devem manter-se os documentos que comprovem as exigências mencionadas na farmacopeia mais recente (F.P. IX), tais como o boletim de análise e a ficha do produto.

No fim da preparação, procede-se à rotulagem das embalagens. O rótulo deve indicar:

- Nome do doente;
- Fórmula do medicamento manipulado prescrita pelo médico (no caso de se tratar de uma fórmula magistral);

- Número do lote atribuído ao medicamento preparado;
- Prazo de utilização do medicamento preparado;
- Condições de conservação e utilização do medicamento preparado;
- Via de administração;
- Posologia, quando indicada;
- Identificação da farmácia;
- Identificação do farmacêutico diretor técnico.

Posteriormente, calcula-se o preço do manipulado com base no valor dos honorários da preparação (são atualizados anualmente), das matérias-primas e dos materiais de embalagem acrescido o valor do IVA à taxa e de acordo com a legislação em vigor (15). O Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) disponibiliza uma plataforma online para apoio técnico-científico focada na preparação de medicamentos manipulados, a qual foi consultada para facilitar o cálculo do preço dos referidos medicamentos. Alguns dos medicamentos manipulados são abrangidos pelo regime de comparticipação do Serviço Nacional de Saúde, tendo uma comparticipação correspondente a 30% do respetivo preço de venda ao público (16). Para tal, o manipulado deve ser prescrito através dos códigos oficiais atribuídos pelo INFARMED I.P. Quando não são abrangidos pela comparticipação, os manipulados podem ser prescritos na receita médica mediante indicação da(s) substância(s) ativa(s), respetivas dosagens, excipientes e a forma farmacêutica.

Durante o período de estágio curricular participei na preparação de dois manipulados: pomada Propionato de clobetasol (Dermovate®) e ácido salicílico em vaselina e pomada de betametasona (Betnovate®) em vaselina sólida.

Além de medicamentos manipulados, também se podem fazer preparações extemporâneas na farmácia. Nestes casos os medicamentos pouco estáveis são reconstituídos apenas no ato da dispensa. O exemplo mais comum na farmácia consiste na reconstituição de antibióticos em pó, ou seja, prepara-se uma suspensão oral na qual se dissolve o pó numa quantidade de água purificada pré-definida pelo fabricante. Este procedimento deve seguir as regras de preparação específicas para o medicamento em causa. Esta técnica é utilizada principalmente para prolongar a estabilidade e, conseqüentemente, a validade dos medicamentos. Tal como em todos os outros medicamentos e produtos de saúde, deve-se alertar o utente para o prazo de validade após reconstituição, para as condições de conservação e todas as indicações específicas necessárias à correta administração.

9. Farmacovigilância

O desenvolvimento da indústria farmacêutica na produção de medicamentos trouxe inúmeros benefícios à saúde dos doentes, no entanto, é de conhecimento geral que nenhum dos medicamentos é totalmente seguro para todos os doentes em todas as condições, da mesma maneira que nenhum é totalmente desprovido de efeitos secundários. Com o objetivo de detetar, avaliar, compreender e prevenir os efeitos adversos ou qualquer problema relacionado com o uso dos medicamentos surgiu a farmacovigilância. Atualmente, existem 9 unidades de farmacovigilância em Portugal, das quais destaco a Unidade de Farmacovigilância da Beira Interior (17).

Apesar dos medicamentos serem sujeitos a ensaios clínicos que comprovem a sua segurança e eficácia antes da autorização de introdução no mercado, estes ensaios não permitem um conhecimento completo, por exemplo, dos efeitos a longo prazo dos medicamentos nem das reações tardias aos mesmos (17). Desta forma, existem diversos efeitos e reações que apenas podem ser detetadas durante a comercialização dos medicamentos. É neste âmbito que o farmacêutico, enquanto profissional de saúde, deve estar atento a todos os efeitos negativos associado ao uso do medicamento exposto pelos utentes, de forma a poder contribuir para a proteção da saúde pública e da segurança do doente. Ao deparar-se com alguma suspeita de reação adversa ao medicamento (RAM), o farmacêutico tem o dever de notificá-la ao Sistema Nacional de Farmacovigilância ou à Unidade de Farmacovigilância mais próxima através do preenchimento de um formulário em suporte papel ou online no portal RAM.

Durante o estágio, tive a oportunidade de reportar uma RAM à Unidade de Farmacovigilância da Beira Interior relativamente ao medicamento Socian® 50 mg/10 ml solução oral (anexo IV).

Os medicamentos e dispositivos médicos estão constantemente sob vigilância do INFARMED, I.P. Com base na revisão da segurança e eficácia dos mesmos, por vezes é necessário retirar alguns produtos do mercado de forma temporária ou permanente. Nestas situações, o INFARMED, I.P envia, para as farmácias, circulares informativas com a indicação do produto a retirar, forma farmacêutica, dosagem, lote, prazo de validade e o titular de AIM. Durante o estágio chegaram à farmácia, pelo menos, duas circulares informativas: uma referente aos medicamentos contendo fosfomicina de 2g e outra referente ao medicamento tamiflu 75mg (oseltamivir) (18,19). Após a chegada das circulares, é verificado o *stock* dos medicamentos em causa e procede-se à sua devolução.

10. Serviços adicionais

Além da dispensa de medicamentos, as farmácias são cada vez mais reconhecidas por serem um espaço de prestação de serviços na área da saúde necessários à promoção da saúde e do bem-estar dos utentes.

Tal como referido no ponto 2.2.2 a farmácia dispõe de um conjunto de serviços personalizados para o utente, tais como medição de parâmetros bioquímicos como a glicémia, colesterol total e triglicéridos, medição da pressão arterial, administração de injetáveis e vacinas excluídas do plano nacional de vacinação, consultas de nutrição, teste de gravidez e outros testes *point of care*, e preparação individual de medicação (PIM).

Sempre que se presta qualquer um dos serviços ou testes acima mencionados, é importante revelar não só os resultados ao utente como esclarecer todas as dúvidas e implicações associadas a cada resultado como, por exemplo, aconselhamento de medidas não farmacológicas ou farmacológicas ou consultar um médico. Como forma de complemento, entrega-se ao utente um cartão onde se registam todas as medições feitas. Além disso, o registo dos valores obtidos também deve ser feito no sistema informático, caso o utente tenha uma ficha de acompanhamento. Estas medições possibilitam ao farmacêutico acompanhar a situação clínica do utente em específico.

Os equipamentos utilizados para realizar as medições dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos são certificados e calibrados anualmente. No caso específico dos medidores de glicémia e de colesterol eles são testados através de soluções controlo que verificam se o medidor e as tiras de teste estão a funcionar corretamente. Estes testes realizam-se sempre que se abre uma nova embalagem de tiras de teste e o resultado obtido deve estar de acordo com o intervalo de valores apresentado na embalagem das tiras.

São diversas as causas de não adesão à terapêutica. Para superar esta dificuldade, a Farmácia Vitória oferece um serviço, Preparação Individual da Medicação, adaptado às necessidades de cada utente com o intuito de promover a adesão à terapêutica. Para tal, o farmacêutico encarrega-se de preparar a medicação semanal nos respetivos sistemas personalizados de dispensação (SPD) (ver anexo V). Este serviço é benéfico principalmente para doentes com dificuldades na toma dos medicamentos, polimedicados, com regimes terapêuticos complexos e com baixa adesão ao tratamento. No entanto, há formas farmacêuticas que não podem ser dispensadas através destes sistemas, como por exemplo, comprimidos efervescentes, orodispersíveis, adesivos transdérmicos e xaropes (20).

A adesão a este serviço não implica qualquer fidelização do utente à farmácia, podendo este abandonar o serviço a qualquer momento. Antes de se selarem os SPD, existe uma dupla verificação da medicação preparada, sendo esta efetuada por um farmacêutico distinto, de forma a diminuir potenciais erros. No ato da entrega, é importante explicar como está identificado o SPD, como se usa, como se deve conservar, o prazo de validade e que o mesmo pode retomar à farmácia no final da sua utilização, caso seja um SPD reutilizável. Os principais objetivos da PIM consistem em ajudar o utente a minimizar os esquecimentos das tomas e melhorar o cumprimento farmacoterapêutico na dosagem e hora certas, tendo em vista a melhoria da saúde do utente.

No decorrer do estágio, os doentes diabéticos que utilizam o sensor *Freestyle Libre* foram contactados para se deslocarem à farmácia com o intuito de atualizarem, gratuitamente, o seu leitor aquando da troca de sensor. Este aspeto é bastante relevante, uma vez que o leitor deixa de ler o sensor antigo após ser atualizado para a nova versão. Esta atualização permite uma maior exatidão na leitura dos resultados com leituras de glicose mais próximas das do sangue do doente, o que contribui para um maior autocontrolo da glicémia (21).

Ao longo do estágio, tive muitas oportunidades para prestar estes serviços aos utentes. Esta função permitiu-me aliar os conhecimentos teóricos sobre os valores de referência à execução prática de diversas medições, como, por exemplo, da pressão arterial e da glicémia. Além disso, também auxiliiei os farmacêuticos da Farmácia Vitória na preparação individual da medicação.

11. Programa Troca de Seringas

O programa troca de seringas surgiu da necessidade de prevenir a transmissão, por via sexual, endovenosa e parentérica, das infeções provocadas pelos vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), Hepatite B e C entre os consumidores de drogas injetáveis. Este programa assegura a distribuição de *kits* com material esterilizado, assim como, a recolha e destruição do material utilizado (22).

Os *kits* são constituídos por duas seringas, dois toalhetes, duas ampolas de água bidestilada, duas carteiras com ácido cítrico, dois filtros, dois recipientes e um preservativo, sendo cedidos aos utilizadores após a devolução das seringas usadas no contentor de corto-perfurantes (22).

Na farmácia Vitória esta troca é efetuada no gabinete de atendimento personalizado, de forma a garantir a privacidade dos utentes. Para determinar o impacto desta ação, uma vez que é um serviço pago à farmácia, é necessário registar os *kits* no sistema informático.

Ao longo do estágio efetuei algumas trocas de seringas usadas.

12. VALORMED

Durante o atendimento é importante alertar os utentes para a importância de devolver os resíduos dos medicamentos, não só por uma questão ambiental, mas também de saúde pública, na medida em que se tenta minimizar a quantidade de medicamentos acumulados nas habitações dos utentes, e conseqüentemente, reduzir a possibilidade de automedicação. Esta foi uma mensagem que tentei transmitir em muitos dos atendimentos que realizei, dando ênfase à importância da Valormed.

A Valormed é uma sociedade sem fins lucrativos responsável por gerir os resíduos de embalagens vazias e medicamentos fora de uso. A sua missão passa por fazer a gestão, recolha e tratamento destes resíduos, colocando pontos de recolha nas farmácias e locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica, além de, consciencializar a população e a comunidade do setor farmacêutico para a preservação ambiental e proteção da saúde pública (23).

A Valormed disponibiliza contentores às farmácias onde são colocados os medicamentos (de uso humano ou veterinário) fora de uso, embalagens vazias e todos os materiais que estiveram em contacto com o medicamento, quer sejam seringas doseadoras (sem agulha), colheres, ampolas ou blisters.

Quando o contentor estiver completamente cheio é selado e regista-se a saída do mesmo no sistema informático, o qual emite um talão que contém informação relativa à farmácia, o número de série do contentor de recolha, um campo para assinatura do farmacêutico e um campo para assinatura do armazenista, devendo ser anexado ao contentor. Mais tarde, é recolhido pelo armazenista (neste caso a Plural), que se encarrega de o devolver à plataforma da Valormed. Algumas embalagens são recicladas enquanto que outros resíduos são utilizados para valorização energética (23).

13. Cartão Farmácias Portuguesas

A Farmácia Vitória faz parte do grupo das Farmácias Portuguesas sendo, por isso, um promotor do Cartão Saúde.

Os utentes que aderirem ao Cartão Saúde têm a possibilidade de acumular pontos por cada compra efetuada na farmácia, quer seja de MNSRM, produtos de saúde e bem-estar ou serviços na área da saúde. Posteriormente, estes pontos podem ser trocados

diretamente por produtos do catálogo de pontos ou transformados em vales de dinheiro possíveis de descontar num pagamento a efetuar na farmácia (24).

Adicionalmente, têm acesso a promoções exclusivas, a vales de descontos da indústria, à Revista Saúde e, de forma opcional, à aplicação das Farmácias Portuguesas no telemóvel (24). A farmácia pode ainda direcionar o envio de algumas campanhas por via e-mail ou mensagem através dos dados que constam no cartão de cada utente.

A Aplicação das Farmácias Portuguesas é uma plataforma com diversas utilidades e funcionalidades, tais como, alertas para toma de medicamentos, registo de dados biométricos, conteúdos informativos, compras e reservas online nas farmácias aderentes, acesso ao histórico da medicação e até gerir a conta saúde através da associação do cartão (25).

14. Contabilidade e Gestão

14.1 Processamento e faturação do receituário

O processamento do receituário é efetuado mensalmente pela farmácia, de maneira a assegurar o reembolso do valor das participações já adiantadas pela farmácia aos utentes durante o atendimento. Este processo tem um grande impacto na rentabilidade e gestão da farmácia devendo, por isso, ser realizado de forma eficaz e eficiente, assegurando a inexistência de erros.

No caso das receitas manuais e materializadas a farmácia deve fazer uma segunda verificação para garantir a conformidade com as normas de prescrição e dispensa (anteriormente referidas), os campos de responsabilidade da farmácia (carimbo e assinatura do responsável pela dispensa) e analisar se não houve erros na dispensa.

As receitas dispensadas ao longo do mês são separadas por tipo a que pertencem e consoante as entidades responsáveis pelas participações em lotes de 30 receitas no máximo. A atribuição do número e lote da receita é automática e é realizado pelo sistema informático. Os lotes são fechados às 23h59 do último dia do mês, podendo depois realizar-se a faturação dos mesmos.

Através do SIFARMA 2000 procede-se à emissão, quando aplicável, dos documentos de faturação como os verbetes de identificação de lotes, relação resumos de lotes, faturas mensais, guias de faturas e guias de transporte para os CTT expresso.

O verbete de identificação de lote resume as receitas dispensadas num determinado lote, discriminando o número de lote, número de receitas que o constituem, número de

embalagens dispensadas, PVP, o valor pago pelo utente e o valor da comparticipação do organismo em questão. Este documento é anexado às receitas correspondentes.

As receitas materializadas e os documentos de faturação emitidos ao SNS são enviados por correio para o Centro de Controlo e Monitorização do Serviço Nacional de Saúde (CCM SNS). Dos 4 exemplares dos documentos relação resumo de lotes e fatura mensal, 3 são enviados juntamente com o receituário e um é arquivado na farmácia. Além disso, é necessário anexar uma guia de fatura e uma guia de transporte para os CTT expresso na embalagem.

A faturação correspondente a outras entidades que não o SNS (exemplo Caixa Geral de Depósitos) é enviada para a ANF, que se encarrega de reencaminhar a documentação para as entidades responsáveis. Nestes casos são enviadas três cópias, assinadas, datadas e carimbadas, da relação resumo de lotes e da fatura mensal. Após a conferência da documentação, as entidades utilizam a mesma via para proceder ao reembolso do valor das comparticipações.

Quanto às receitas sem papel, estas são incluídas em lotes únicos sem limite máximo de receitas. Nestes casos, os documentos contabilísticos são enviados através do SIFARMA 2000 em formato desmaterializado no entanto, é necessário enviar uma guia de fatura eletrónica.

Quando se deteta alguma irregularidade após a conferência da documentação pelas entidades, disponibilizam-se à farmácia os erros e diferenças identificadas, com referência da respetiva fatura e justificação. Os documentos que possam ser alvo de correção serão devolvidos à farmácia, a qual poderá integrar novamente estes documentos retificados na faturação do mês seguinte emitindo uma nota de crédito (valores em dívida pela farmácia) ou de débito (valores em dívida à farmácia).

Durante a minha permanência na Farmácia Vitória pude presenciar o processamento e o fecho da faturação do mês de abril.

15. Outras atividades

Uma forma de complementar os benefícios dos medicamentos na saúde dos utentes passa por adotar hábitos de vida saudáveis. Para tornar essa missão mais fácil e compreensível pelos cidadãos em geral é fundamental promover estes estilos junto da comunidade. Assim a Farmácia Vitória em parceria com a Unidade de Cuidados na Comunidade do Fundão (U.C.C. Fundão) e o Agrupamento de Centros de Saúde da Cova da Beira (ACeS Cova da Beira) promoveram o II Seminário de Oncologia do Fundão

intitulado “Alimentação e Cancro” no qual tive a oportunidade de participar (anexos VI e VII). De forma a sensibilizar a população para a temática do cancro, os colaboradores da Farmácia Vitória associaram-se ao Núcleo da Liga Portuguesa Contra o Cancro do Fundão para promover a campanha "Dou mais tempo à vida" e vestiram uma das t-shirts desta campanha.

Além das atividades mencionadas, também assisti a duas formações sobre o projeto *Kaizen* - Melhoria Contínua, que está a ser instituído na farmácia, e sobre produtos de podologia.

O projeto *Kaizen* assenta numa filosofia de melhoria contínua e diária envolvendo todas as áreas da farmácia e todos os seus colaboradores. É uma prática adotada que visa atingir resultados cada vez melhores seja nos produtos, serviços disponibilizados ou até nos processos internos. O objetivo central é identificar a causa dos problemas para posteriormente os resolver. Alguns dos seus princípios baseiam-se na criação de valor para o cliente, envolvimento dos colaboradores e eliminação do desperdício. Durante o estágio realizaram-se diversas reuniões *Kaizen* para transmissão de informações gerais, melhorar a organização das equipas e do espaço envolvente e para motivar os colaboradores.

Dada a situação do país com o surto e disseminação do novo coronavírus, durante o período de estágio não foi possível realizar qualquer atividade na comunidade. No entanto, propus-me a elaborar um dossier com instruções ilustradas passo a passo, recomendações e cuidados a ter para os dispositivos médicos inalatórios disponíveis na farmácia. Esta ideia surgiu no seguimento de uma dificuldade sentida durante um atendimento de uma utente. Esta solicitou-me uma explicação do funcionamento do inalador e uma exemplificação de uma toma. Com este documento pretende-se que a equipa da farmácia consiga mimetizar uma correta técnica inalatória de forma mais rápida, simples e intuitiva. Além disso, o vocabulário utilizado nos documentos é bastante simples ao qual estão associadas imagens ilustrativas que facilitam a interpretação, quer por parte do profissional de saúde, quer pelo doente. Deste modo, é possível facultar uma cópia ao utente, como reforço de toda a informação oral disponibilizada (ver anexo VIII).

16. Pandemia Covid-19 e as suas influências na farmácia comunitária

No final do ano de 2019, surgiu um surto de pneumonia, cuja causa se desconhecida, na cidade de Wuhan, na China. Pouco tempo depois, as autoridades de saúde chinesas concluíram que a causa desta infeção pulmonar se devia a um novo coronavírus (SARS-CoV-2) (26). Este grupo de vírus RNA, com origem nos animais, pode também ser transmitido entre os humanos e provocar problemas respiratórios graves (26). O surto espalhou-se rapidamente por vários países de todo o mundo sendo responsável por milhares de casos infeção e em muitos deles foi a causa de morte.

SARS-CoV-2 significa “síndrome respiratória aguda grave – coronavírus 2” sendo que a doença associada é conhecida como COVID-19 (“Doença do Coronavírus”) (26). São diversas as vias de transmissão de pessoa-a-pessoa do vírus, nomeadamente através de gotículas de secreções respiratórias, do contacto com superfícies contaminadas e posterior contacto com as mãos no nariz, olhos ou boca, de aerossóis e de feridas abertas (26,27). O período de incubação deste novo coronavírus varia entre os 2 e os 14 dias, após o qual as pessoas podem apresentar diversos sintomas como febre, cefaleias, tosse, fraqueza generalizada, dores musculares, dificuldades em respirar, podendo evoluir para situações de pneumonia, insuficiência renal e respiratória (26). Até à data não existe nenhum tratamento específico nem vacina para a COVID-19, portanto a medida mais eficaz de prevenção é minimizar a possibilidade de contágio.

Em Portugal, o primeiro caso confirmado de COVID-19 surgiu em março de 2020 e como medida de controlo da propagação da doença foi decretado Estado de Emergência Nacional acompanhado de um regime de confinamento domiciliário obrigatório. Tal como todos os outros setores, a farmácia comunitária teve de se adaptar a esta nova realidade com planos de contingência. Numa fase inicial, as preocupações do setor farmacêutico baseavam-se em garantir a segurança dos colaboradores e utentes, manter o ambiente de trabalho o mais normal possível e aumentar os *stocks*, de forma a que nenhum utente ficasse sem a medicação durante o período de estado de emergência.

Procurando salvaguardar a saúde pública e a prestação dos serviços farmacêuticos à população, na Farmácia Vitória foram implementadas medidas de proteção individual e coletiva com a utilização obrigatória de máscaras, viseiras e luvas para os colaboradores, a equipa foi subdividida em turnos, o horário de funcionamento foi reduzido, fixaram-se acrílicos de proteção em todos os balcões de atendimento, assim como, dispensadores de desinfetante de mãos e de superfícies. Colocaram-se fitas de contenção de forma a

delinear a circulação dos utentes e do espaço onde poderiam chegar para ser atendidos garantindo a distância mínima de 1,5 a 2 metros entre os utentes e a equipa da farmácia, limitou-se o número de utentes permitido no interior da farmácia, pedindo a todos os restantes para aguardarem pela sua vez no exterior. Colocou-se na entrada um aviso com as principais recomendações que os utentes devem adotar antes de entrar (ex: desinfetar as mãos, manter a distância de segurança, preparar previamente as receitas que necessita de levantar, manter a etiqueta respiratória, entre outros) e posters da DGS (anexo IX). Disponibilizaram-se documentos das Farmácias Portuguesas com informações sobre a doença, medidas de prevenção do contágio e de higiene a adotar (anexos X e XI). Também se interrompeu temporariamente a medição dos parâmetros bioquímicos e fisiológicos por exigirem um contacto mais próximo com os utentes e cancelaram-se todas as consultas de nutrição e podologia durante este período. Além destas medidas, capacitou-se toda a equipa com informações epidemiológicas e técnico-científicas acerca das características do vírus e da doença, de forma a que todos fossem capazes de identificar e agir perante um caso suspeito e promover as medidas de prevenção da infeção. Contudo, sempre que exista alguma dúvida ou problema relacionado com a COVID-19 os farmacêuticos podem recorrer gratuitamente à Linha de Apoio ao Farmacêutico (LAF) para os esclarecer.

Com o intuito de assegurar a continuidade do tratamento, reduzir as deslocações dos doentes aos serviços farmacêuticos hospitalares e minimizar o risco de contágio, surgiu a “Operação Luz Verde” (28). Este serviço resulta de uma articulação da Ordem dos Farmacêuticos, Ordem dos Médicos e outras associações do setor do medicamento para facilitar a dispensa, nas farmácias comunitárias ou ao domicílio (consoante a preferência do utente), de medicamentos dispensados exclusivamente nos hospitais em regime ambulatorio (28).

A adesão a este serviço pode ser realizada por contacto com o hospital onde o utente costuma levantar a medicação de uso hospitalar, com uma farmácia (preferencialmente naquela onde costuma ser seguido) ou através da linha “1400”. Posteriormente, a farmácia e a linha 1400 articulam-se com a LAF para contactar o hospital. Cabe a este último a avaliação e decisão sobre a possibilidade de o utente aceder ao medicamento na farmácia. A dispensa de medicamentos através da Operação Luz Verde não acarreta custos para o utente, contudo estes são suportados por outras entidades.

Depois do hospital aprovar o pedido e do utente escolher a farmácia onde quer adquirir a medicação, a LAF notifica a farmácia e o distribuidor grossista encarrega-se de entregar o medicamento à respetiva farmácia. Assim que esta recebe o medicamento, entra em contacto com o doente para agendar a dispensa do mesmo, promovendo o

esclarecimento de qualquer dúvida associada. Desta forma, as farmácias comunitárias proporcionam uma intervenção farmacêutica gratuita aos doentes hospitalares. No final do processo é feito um registo da dispensa no SIFARMA 2000 acompanhado por uma comunicação à LAF. Caso seja necessária uma nova dispensa de medicamentos, recomenda-se que o utente volte a contactar o hospital, pelo menos, quinze dias antes do término da medicação. Durante o estágio foram vários os utentes que recorreram à Farmácia Vitória para levantar este tipo de medicação (anexo XII).

Uma das medidas de maior contributo para evitar a disseminação da COVID-19 passa pelo distanciamento social. Neste sentido, a Farmácia Vitória estabeleceu uma parceria com a Câmara Municipal do Fundão para a entrega ao domicílio de medicamentos e produtos de saúde aos utentes com mais de 65 anos residentes no concelho ou com necessidades especiais ou doença crónica comprovada, como medida de proteção.

Durante esta crise de saúde pública, as farmácias estiveram sempre na linha da frente no combate à pandemia. Os farmacêuticos desempenham um papel fulcral no apoio à comunidade, fornecendo informações seguras, tranquilizando e capacitando os utentes de meios para impedir a propagação do vírus e de proteção. Além disso, os farmacêuticos contribuíram para aliviar a pressão nos hospitais e outros sistemas de saúde ao diminuir as visitas aos serviços de urgência, com a identificação e gestão dos potenciais casos de COVID-19. Adaptaram a sua disponibilidade, modo de trabalho e adotaram medidas de exceção para poderem chegar a todos os cidadãos, asseguraram um reforço de *stocks* de medicamentos e equipamentos de proteção individual, cederam a medicação necessária ao doente para um prazo máximo de dois meses, incentivaram e esclareceram a importância da continuidade da terapêutica num período em que a saúde pública foi abalada com a disseminação do vírus.

17. Considerações finais

No geral, este estágio foi bastante enriquecedor, quer a nível pessoal, como profissional. Se por um lado me fez crescer técnica e cientificamente enquanto futura farmacêutica, por outro mostrou-me o lado mais humano e emocional de toda a equipa da farmácia e dos utentes.

Cada dia na farmácia é um dia diferente. Há sempre novos desafios que nos fazem aplicar os conhecimentos adquiridos durante a formação académica, mas que dão asas para aprender outros tantos.

A prática farmacêutica está, agora, focada no atendimento personalizado no sentido de fornecer o aconselhamento mais centrado no utente, enfatizando a importância do papel clínico do farmacêutico na promoção da saúde e do bem-estar geral.

Devido à maior proximidade que se estabelece entre os farmacêuticos e os utentes da farmácia, os primeiros conhecem o utente enquanto pessoa e conseguem conhecer melhor a saúde do utente em causa. Para não falhar aos seus utentes e transmitir todas as informações com segurança, o farmacêutico deve acompanhar a evolução do conhecimento científico e manter-se atualizado.

Agradeço a toda a equipa da Farmácia Vitória por todos os ensinamentos inculcados para conseguir prestar um serviço de qualidade à comunidade, pela excelente integração na equipa e por fornecerem muitas das capacidades necessárias para incorporar o mundo da farmácia comunitária.

18. Referências Bibliográficas

1. Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF). 3ª Edição, Conselho Nacional da Qualidade, 2009.
2. Decreto-Lei nº 307/2007 de 31 de agosto. Regime jurídico das farmácias de oficina. Legislação Farmacêutica Compilada. INFARMED.
3. Deliberação nº 1502/2014 de 3 de julho. Diário da República, 2ª série, nº 145, de 30 de julho de 2014.
4. Decreto-Lei nº 176/2006 de 30 de agosto. Legislação Farmacêutica Compilada. INFARMED.
5. Portaria nº 224/2015 de 27 de julho. Diário da República, 1ª série, nº 144, 27 de julho de 2015.
6. Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde. Versão 6, pp.1-42, INFARMED, ACSS e Ministério da Saúde, 2019.
7. Portaria nº 195-D/2015 de 30 de junho. Regime jurídico das farmácias de oficina. Legislação Farmacêutica Compilada. INFARMED.
8. Portaria nº 35/2016 de 1 de março. Diário da República, 1ª série, nº 42, 1 de março de 2016.
9. Portaria nº 15/2018 de 11 de janeiro. Diário da República, 1ª série, nº 8, 11 de janeiro de 2018.
10. Decreto-Lei nº 189/2008 de 24 de setembro. Diário da República, 1ª série, nº 185, 24 de setembro de 2008.
11. Decreto-Lei nº 136/2003 de 28 de junho. Diário da República 1ª série - A, no 147, 28 de junho de 2003.
12. Decreto-Lei nº 314/2009 de 28 de outubro. Diário da República, 1ª série, nº 209, 28 de outubro de 2009.
13. Decreto-Lei nº 145/2009 de 17 de junho de 2009. Diário da República, 1ª série, nº 115, 17 de junho de 2009.
14. Portaria nº 594/2004 de 2 de junho. Diário da República, 1ª Série-B, nº 129, 2 de junho de 2004.
15. Portaria nº 769/2004 de 1 de julho. Diário da República, 1ª Série-B nº 153, 1 de julho de 2004.
16. Despacho n.º 18694/2010, 18 de novembro. Diário da República, 2ª Série-B nº 242, 16 de dezembro 2010.

17. Farmacovigilância em Portugal: 25 anos. Disponível em http://app10.infarmed.pt/e_book_farmacovigilancia25/index.html, consultado a 03/05/2020
18. Circular Informativa N.º 111/CD/100.20.200: Medicamentos contendo fosfomicina – Alteração e Suspensão de Autorizações de Introdução no Mercado, INFARMED, 2020 p.1-3.
19. Circular Informativa N.º116/CD/550.20.001: Recolha voluntária de lotes do medicamento Tamiflu, oseltamivir, 75 mg, cápsula, INFARMED, 2020.
20. Norma N.º30-NGE-00-010-02, Preparação Individualizada da Medicação (PIM), Ordem dos Farmacêuticos, 2018.
21. Freestyle abbott – Perguntas frequentes. Disponível em: www.freestyle.abbott/pt/pt/atualização-leitor/suporte.html, consultado a 05/06/2020
22. Programa Troca de Seringas. Disponível em: <http://spms.min-saude.pt/servicospartilhados-de-saude>, consultado a 08/03/2020
23. VALORMED. Disponível em: <http://www.valormed.pt/>, consultado a 15/05/2020.
24. Cartão Saúde. Disponível em: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/saуда/como-funciona>, consultado a 25/03/2020.
25. APP das Farmácias Portuguesas. Disponível em <https://www.farmaciasportuguesas.pt/app> , consultado a 25/03/2020.
26. Plano de Contingência COVID-19 Farmácia, Versão 03 de Abril de 2020, Cedime, 2020, p.1-71.
27. Norma N.º 003/2020: Infeção por SARS-CoV-2 (COVID-19) Farmácias comunitárias, Direção Geral da Saúde, 2020, p.1-14.
28. Circular Normativa_N.º 005/CD/550.20.001: Orientações sobre acesso de proximidade a medicamentos dispensados em regime ambulatorio de farmácia hospitalar no atual contexto de pandemia por COVID-19, INFARMED, 2020 p. 1-9.

19. Anexos

Anexo I – Nota de devolução

FARMACIA VITORIA
RUA 5 DE OUTUBRO 26-28
6230-341 FUNDÃO

NIF: 502083573
Telefone: 275752106
Dir. Téc. DRA MARIA ALCINA
NEVES DE ANDRADE
LEAL

de 19-02-2020
Triplicado

Cód. Farmácia: 10507

Nota de Devolução Nº G014/77

Para: Plural - Cooperativa Farmacéutica, L.da
Rua Adriano Lucas, Apartado 8144 3021-997

NIF: 500349142

Motivo - Fora de Prazo	Lote	Val.	Qtd.	Pr. Custo	Pr. Venda	IVA	Origem
8372557 Sinemet, 250/25 mg x 60 comp, 250			1	6,65€	9,48€	6%	8225543193
Quantidade Total:			1				Custo Total: 6,65€ PVP Total: 9,48€

Observações:
VALIDADE A TERMINAR. COLOCAR A CRÉDITO. OBRIGADA.

Carga	Descarga
Local: RUA 5 DE OUTUBRO, 26-28 Inicio: 19-02-2020 11:50:59 Veiculo: Código AT: 9083178450	Local: Rua Adriano Lucas, Apartado 8144 3021-997 Fim: Recebido Por:

91067

Inês

Operador: ESTAGIARIO 1

Página 1

ts1h-Processado por programa certificado nº 432/AT

Anexo II – Prescrição de medicina veterinária de MSRM

ORIGINAL

Série: 100 N°: 105873457
100507201058734572

Clínica Veterinária da Covilhã
Quinta das Ferreiras - Boidobra

Proprietário: Bob
Animal:
Espécie: Caninos


Rx	Nome, dosagem, forma farmacêutica, magistral, posologia	Nº	Extenso	Identificação ótica
1	Omeprazol, 40mg, oral Posologia: Administrar, por via oral, um comprimido por dia durante dez dias.	1	um	
2	Flagyl, 250mg, oral Posologia: Administrar, por via oral, três comprimidos a cada doze horas durante oito dias.	2	dois	
3				
4				

Data: 2020-07-05

CAR No: [Barcode]

(Assinatura do Médico Veterinário)

Anexo III- Prescrição de medicina veterinária de um MNSRM




Animal: Gatinho preto

Proprietário: _____

R/ Lasa 10mg teubalagen





S: Administrar, por via oral, meio comprimido por dia durante 10 dias.



Dra. Carolina Luísa
Geraldes Silva
CP. 20001 - 301275-00735
Covilhã

MORADA: Apartado 44, 6201-909 Covilhã | Portugal | 24h | URGÊNCIAS: +351 275 325 795 | EMAIL: info@clinicaveterinariadacovilha.com | WWW.CLINICAVETERINARIADACOVILHA.COM

Anexo IV – Notificação de uma RAM

Sistema Nacional de Farmacovigilância - Notificação de Suspeita de Reações Adversas a Medicamentos	
 REPÚBLICA PORTUGUESA SAÚDE	 Infarmed Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
Nº de Submissão	Data Submissão
FO-PS-V202007-707	23-07-2020
Reações Adversas	
Reação 1	
Descrição da RAM	
Endurecimento e sensibilidade aumentada dos seios acompanhados de dor, aumento de volume de ambos os seios e galactorreia. Mais tarde verificou um aumento de peso e sensação de enfartamento.	
Evolução da Reação	Crítérios de Gravidade
Em Recuperação	Clinicamente importante
Data de Início	Data de Fim
30-06-2020	
Duração da Reação	Causalidade
2 Semanas	Provável
Descrição do Tratamento	
Suspendeu a terapêutica (por indicação médica)	
 REPÚBLICA PORTUGUESA SAÚDE	 Infarmed Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
Medicamentos	
Medicamento 1	
Medicamento	
Socian/Amissulprida, Solução oral, 50 mg/10 ml	
Lote	Tipo de Autorização
	AIM - Autorização de Introdução no Mercado
Data de Início	Data de Fim
27-06-2020	10-07-2020
Via da Administração	Dosagem
Oral (via)	50 mg/10 ml
Forma Farmacêutica	Medida Tomada
Solução oral	Dose Inalterada
Indicação Terapêutica	
Fadiga e nervosismo	
Doente	
Iniciais	Sexo
F.M.S.B.R.	Feminino
Data de Nascimento	Idade à Data da RAM
31-12-1975	44 Anos
Peso (kg)	Altura (cm)



Notificador

Nome Próprio

Inês

Apelido(s)

Candeias Martins

Concelho

Fundão

Local de Trabalho

VITORIA

Código Postal

6230-341

Localidade

Fundão

Qualificação

Farmacêutico

Email

farmaciavitoriafundanense@gmail.com

Telefone/Telemóvel

275752106

Nº Carteira/ Cédula Profissional



Outra Informações

Medicamento Concomitante

Lexotan 1,5mg e Cosyrel 5/5mg

Ocorreu Erro de Medicação ?

Não

Outras Informações

Anexo V -Preparação individualizada da medicação

venalink
MEDICATION MADE SIMPLE

Nome e apelido: [Redacted] Oceane Código: [Redacted]

Nome: [Redacted] Farmácia Morada e Tel.: [Redacted] Farmácia

Data da preparação: [Redacted] Médico Prescritor: [Redacted]

Semana de [Redacted] a [Redacted]

Recomendações

- ✓ O seu farmacêutico preparou este SPD® Venalink (Sistema Personalizado de Dispensação®) para facilitar a administração dos seus medicamentos.
- ✓ Tome os medicamentos deste blister respeitando o dia da semana e o momento do dia.
- ✓ Se o seu médico alterou a sua medicação informe o seu farmacêutico.
- ✓ Se necessita de informações sobre os medicamentos colocados no blister pergunte ao seu farmacêutico.
- ✓ Conservar este blister com os medicamentos em lugar fresco, seco, protegido da luz solar e fora do alcance das crianças.

Medicamentos fora do blister Medicamentos fora do blister

Ajudamos a organizar a sua medicação

PEG. ALMOÇO ALMOÇO JANTAR DEITAR

Seg. Ter. Qua. Qui. Sex. Sáb. Dom.

Anexo VI – Certificado de presença no workshop “Alimentação e Cancro”



CERTIFICADO DE PRESENÇA

CERTIFICA-SE QUE Imês Comdeias Martins
PARTICIPOU NO WORKSHOP "**ALIMENTAÇÃO E CANCRO**" NO DIA 15 DE FEVEREIRO DE 2020 NA MOAGEM - FUNDÃO

MINISTÉRIO DA SAÚDE
ARS CENTRO, IP
ACES COVA DA BEIRA
Fundão

DURAÇÃO DE 2 HORAS

Eugénia Lindeza
EUGÉNIA LINDEZA
Coordenadora da UCCF

Alcina Leal
ALCINA LEAL
Directora Técnica da Farmácia Vitória

ACES
UNIDADE DE SAÚDE PÚBLICA

U.C.C.
Fundão

FARMÁCIA VITÓRIA

Anexo VII – Certificado de presença na mesa redonda “Alimentação e Cancro”



CERTIFICADO DE PRESENÇA

CERTIFICA-SE QUE Imês Comdeias Martins
PARTICIPOU NA MESA REDONDA "**ALIMENTAÇÃO E CANCRO**" NO DIA 15 DE FEVEREIRO DE 2020 NA MOAGEM - FUNDÃO

MINISTÉRIO DA SAÚDE
ARS CENTRO, IP
ACES COVA DA BEIRA
Fundão

DURAÇÃO DE 2 HORAS

Eugénia Lindeza
EUGÉNIA LINDEZA
Coordenadora da UCCF

Alcina Leal
ALCINA LEAL
Directora Técnica da Farmácia Vitória

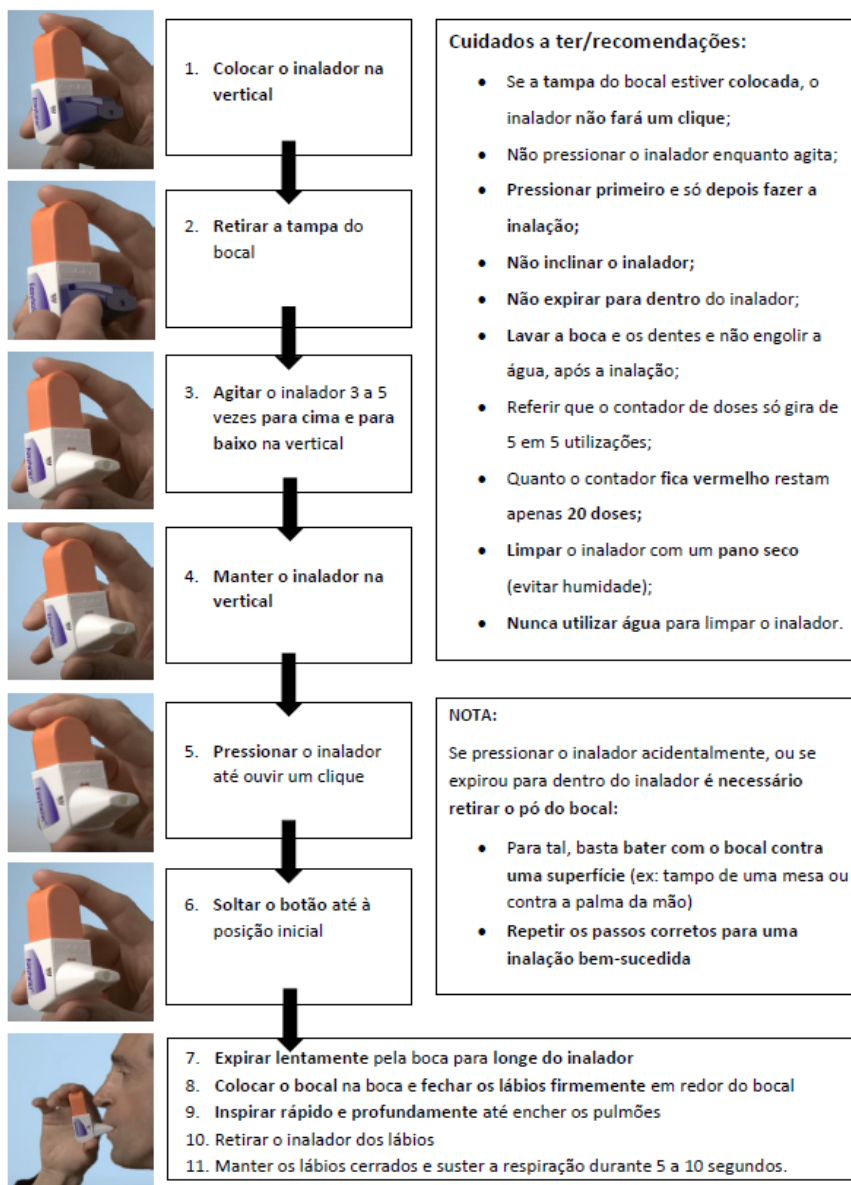
ACES
UNIDADE DE SAÚDE PÚBLICA

U.C.C.
Fundão

FARMÁCIA VITÓRIA

Anexo VIII – Exemplo do funcionamento passo a passo de um dispositivo de inalação

EASYHALER®



Anexo IX – Cartaz com medidas gerais do COVID-19

COVID-19

MEDIDAS GERAIS

HIGIENE DAS MÃOS

Lave frequentemente as mãos com água e sabão ou use uma solução à base de álcool



ETIQUETA RESPIRATÓRIA

Quando espirrar ou tossir, tape o nariz e a boca com um lenço de papel ou com o braço. Deite o lenço no lixo

DISTANCIAMENTO SOCIAL

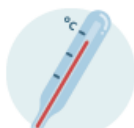
Mantenha a distância de segurança das outras pessoas de 1,5 - 2 metros



SE TIVER ALGUM DOS SEGUINTE SINTOMAS:



TOSSE



FEBRE




DIFICULDADE RESPIRATÓRIA

LIGUE
SNS 24

808 24 24 24

Anexo X – Documento das Farmácias Portuguesas cedido aos utentes

Farmácias Portuguesas



COVID-19 – Conhecer para Prevenir!

O mundo está preocupado com a infeção causada por um novo coronavírus (COVID-19). A melhor forma de combater uma doença é conhecê-la para saber como a prevenir e como atuar perante a suspeita de infeção.

O QUE É O COVID-19?
É a doença causada por um vírus da família dos coronavírus que apresenta, maioritariamente, manifestação semelhantes às da gripe comum:

- febre;
- tosse;
- falta de ar.

Há casos que podem evoluir para doença mais grave, como a pneumonia.

DE ONDE VEM?
ONDE: a maioria dos casos identificados são, à data, na China, no entanto já se detetaram alguns casos noutros países, incluindo a nível europeu.

COMO: ainda não se conhece a fonte da infeção, mas acredita-se que possa ter origem animal – a maioria dos casos iniciais estão associados a pessoas que frequentaram um mercado de alimentos e animais vivos (peixe, marisco e aves), em Wuhan.

DE QUE FORMA SE TRANSMITE O VÍRUS?
Por via respiratória – isto é, por via aérea, nas gotículas expelidas quando se espirra ou tosse, por exemplo.

Pensa-se que também exista transmissão indireta (através de objetos contaminados por pessoas infetadas – por exemplo, ao espirrar), dado que estudos preliminares sugerem que o vírus sobrevive algumas horas nas superfícies contaminadas.

EXISTE TRATAMENTO?
Ainda não existe uma vacina específica para o COVID-19, pelo que a prevenção é essencial.

Assim, e particularmente nos países mais afetados:

Evite o contacto próximo com pessoas com manifestações de infeção respiratória, como tosse, nariz entupido e/ou corrimento nasal e dificuldade respiratória;

Evite o contacto com animais selvagens ou de quinta e o consumo de produtos de origem animal crus ou malcozinhados;

Lave as mãos frequentemente, com água e sabão ou com um produto com álcool a 70º (líquido, gel ou toalhetes), especialmente após partilha de espaço com pessoas potencialmente doentes (por exemplo, nos transportes públicos ou centros comerciais) e sempre que se assoar, espirrar ou tossir;

Adote medidas de etiqueta respiratória – tape o nariz e a boca sempre que espirrar ou tossir, com um lenço de papel ou com o braço (nunca com as mãos). Coloque o lenço de papel no lixo e, se possível, lave as mãos ou desinfete-as com uma solução à base de álcool;

SUSPEITO QUE ESTOU INFETADO. E AGORA?
Portugal está preparado para dar resposta em caso de doença – está em curso a implementação de diversas medidas para prevenção e controlo da infeção.

Se esteve recentemente em zonas afetadas pelo COVID-19 ou se contactou com alguém infetado, vigie possíveis manifestações respiratórias (febre, tosse ou falta de ar) nos 14 dias após o regresso/contacto. Se tiver sinais ou sintomas, ligue de imediato para o SNS 24 (808 24 24 24)

SABIA QUE...?
Já houve mais surtos associados a *coronavirus* (entre 2002 e 2003, foi identificado o *coronavirus* SARS-CoV, responsável pela síndrome respiratória aguda grave e, em 2012, o *coronavirus* MERS-CoV, responsável pela síndrome respiratória do Médio Oriente).

ONDE POSSO OBTER MAIS INFORMAÇÕES?
Estar informado é o primeiro passo! A Direção-Geral da Saúde (DGS) está a acompanhar de perto a situação, validando e disponibilizando continuamente todas as atualizações sobre o COVID-19, em: www.dgs.pt.

COM A AJUDA DESTA FARMÁCIA
Se tem dúvidas sobre os *coronavirus*, informe-se com o seu farmacêutico! A Farmácia está sempre disponível para o apoiar.

copyright © janeiro de 2020, da Associação Nacional das Farmácias

Anexo XI – Documento das Farmácias Portuguesas com medidas de higiene



COVID-19 – Sabe lavar as mãos?

iSaúde

COVID-19 é o nome dado à infeção por um novo coronavírus identificado pela primeira vez em humanos, no final de 2019, em Wuhan, na China.

O QUE É O COVID-19?

É a doença causada por um vírus da família dos coronavírus – estes vírus existem maioritariamente em animais, mas, em algumas circunstâncias, podem causar infeções em humanos, por vezes com algumas manifestações semelhantes às da gripe comum – febre, tosse e falta de ar. Há casos que podem evoluir para doença mais grave, como a pneumonia.

DE QUE FORMA SE TRANSMITE?

Embora não se conheça a origem exata do vírus, acredita-se que, em Portugal, o maior risco de infeção provém do contacto próximo com pessoas infetadas. Sabe-se que o vírus se transmite por via respiratória – isto é, por via aérea, nas gotículas expelidas quando se espirra ou tosse, por exemplo. Pensa-se que também exista transmissão indireta (através de objetos contaminados por pessoas infetadas, por exemplo ao espirrar), dado que estudos preliminares sugerem que o vírus sobrevive algumas horas em superfícies.

Devo utilizar máscara? De momento, a Direção-Geral da Saúde (DGS) não recomenda o uso de máscara de proteção em pessoas sem sintomas.

É POSSÍVEL PREVENIR?

A melhor forma de prevenir o COVID-19 é a adoção de medidas gerais de prevenção das infeções virais:

- Evite o contacto próximo com pessoas com manifestações de infeção respiratória, como tosse, nariz entupido e/ou corrimento nasal e dificuldades respiratórias;
- Evite o consumo de produtos de origem animal crus ou malcozinhados;
- Adote medidas de etiqueta respiratória – tape o nariz e a boca sempre que espirrar ou tossir, com um lenço de papel ou com o braço (nunca com as mãos). Coloque o lenço de papel no lixo;
- Lave as mãos frequentemente, com água e sabão ou com um produto com álcool a 70º (líquido, gel ou toalhete), especialmente após partilha de espaço com pessoas potencialmente doentes (por exemplo, em transportes públicos ou centros comerciais) e sempre que se assoar, espirrar ou tossir;

SABE LAVAR AS MÃOS?

A lavagem das mãos deve durar entre a 40 a 60 segundos.

1. Molhe as mãos com água e aplique sabão de forma a cobrir toda a superfície das mãos;
2. Esfregue:
 - a. as palmas das mãos uma na outra;
 - b. a palma direita sobre as costas da mão esquerda, com os dedos entrelaçados (e vice-versa)
 - c. palma com palma, com os dedos entrelaçados;



- d. a parte de trás dos dedos nas palmas opostas com os dedos entrelaçados;
- e. o polegar esquerdo, entrelaçado na palma direita (e vice-versa);
- f. de forma rotativa, os dedos da mão direita na mão esquerda (e vice-versa);



- g. Enxague as mãos com água e seque-as com um toalhete descartável, utilizando-o para fechar a torneira, se esta for manual.

Caso utilize uma solução antisséptica de base alcoólica para a higiene das mãos, deve esfregar as mãos do modo indicado anteriormente durante 20 a 30 segundos (até a solução secar).

ONDE POSSO OBTER MAIS INFORMAÇÕES?


Estar informado é o primeiro passo! A Direção-Geral da Saúde (DGS) está a acompanhar de perto a situação, validando e disponibilizando continuamente todas as atualizações sobre o COVID-19, em: www.dgs.pt.

COM A AJUDA DESTA FARMÁCIA

Se tem dúvidas sobre estes coronavírus, informe-se com o seu farmacêutico! A Farmácia está sempre disponível para o apoiar.

Anexo XII – Informação da dispensa de um medicamento de uso hospitalar na farmácia comunitária

✓

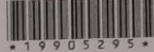


Informação Farmacoterapêutica
Serviços Farmacêuticos C.H.U.C. E.P.E.
 Director: Dr. José Feio

Pág. 1 / 1
 Data: 2020/02/05 15:44:24

Exmo(a) Sr(a):

Local Prescrição: 27042 - HUC-GINECOLOGIA MAMA
 Médico Prescritor:
 Contacto telefónico dos Serviços Farmacêuticos: 239 400405 (Horário: 9h:30 às 12h, 14h às 15h)



* 1 9 9 0 5 2 9 5 *

	9h		
Plano Terapêutico:			
Anastrozol 1 mg Comp :	1 Comprimido	Qty. Fornecida 60	32
Custo Total Cedência: 3.19 Euros			Total a Pagar: 0 Euros

Medicamentos previstos a serem cedidos na próxima consulta farmacêutica:

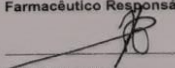
Nome (DCI)
 Anastrozol 1 mg Comp

Informações gerais
 Se tomar medicamentos não deve ingerir bebidas alcoólicas. Não tome uma dose a dobrar para compensar uma dose que se esqueceu de tomar.
 Tome sempre os medicamentos de acordo com as instruções do seu médico ou do seu farmacêutico.
 Caso tenha dúvidas sobre a utilização dos medicamentos, fale sempre com o seu médico ou com o seu farmacêutico.

Termo de Responsabilidade
 Eu, _____ do C.C./S.I nº _____ pelo presente declaro ter recebido toda a informação relevante ao uso e à conservação do(s) medicamento(s) que compõe(m) o meu tratamento responsabilizando-me pela boa utilização do medicamento e por garantir que os mesmos são transportados e armazenados no domicílio de forma a garantir as condições de conservação que me foram indicadas.
 Responsabilizo-me também por qualquer extravio ou dano causado à medicação enquanto esta estiver ao meu cuidado.

Atenção:
 Data de próxima Cons. médica: 13-01-2021
 Data prevista próxima Cons. farmacêutica: 04-04-2021

Farmacêutico Responsável



Entregue Por

Recebido Por
 Próprio
 C/ Autorização

Data: _____ Mec: _____