

Bioatividade de extratos de *Echinacea purpurea*, um potencial ingrediente cosmético

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

Versão final após defesa

Beatriz Xavier Afonso

Relatório para obtenção do Grau de Mestre em

Ciências Farmacêuticas

(Mestrado Integrado)

Orientadora: Professora Doutora Rita Manuela Palmeira de Oliveira

Coorientadora: Doutora Joana Rita Gonçalves Rolo

Coorientadora: Mestre Ana Sofia Domingues Oliveira

março de 2022

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Rita Palmeira de Oliveira, por ter aceitado orientar esta dissertação, pela colaboração e pelos conhecimentos transmitidos.

Às minhas coorientadoras, Joana Rolo e Ana Oliveira, por todo o apoio e disponibilidade que sempre demonstraram durante este longo processo.

A toda a equipa da FSMC por me terem recebido tão bem e por toda paciência que tiveram comigo. Em especial à Rita, à Carolina e à Letícia que, para além de mentoras, tornaram-se amigas para a vida.

Aos meus pais, que ao longo de toda a minha vida fizeram questão de garantir que nada me faltasse, contribuindo para a realização e conquista de tudo aquilo que sonhei e desejei. Sem o apoio incondicional deles, nada disto seria possível.

Ao meu irmão, de quem tenho muito orgulho e que considero, desde sempre, um exemplo a seguir.

Aos meus avós, as estrelinhas que no céu brilham cada vez mais forte para iluminar e guiar o meu caminho.

Aos meus amigos, que estiveram sempre presentes e me deram a força e o incentivo que precisava nas alturas de maior desmotivação.

Obrigada de coração a todos!

Resumo

O presente trabalho encontra-se dividido em dois capítulos que descrevem a minha experiência profissionalizante para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, apresentando uma componente de investigação, bem como uma componente de estágio realizado em Farmácia Comunitária.

O primeiro capítulo é respeitante à componente de investigação laboratorial desenvolvida no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e intitula-se “Bioatividade de extratos de *Echinacea purpurea*, um potencial ingrediente cosmético”.

A procura por ingredientes naturais na indústria cosmética tem aumentado devido às suas propriedades antimicrobianas na preservação de formulações, bem como ao seu potencial antioxidante, que pode ser interessante em produtos antienvhecimento. A *Echinacea purpurea* é cultivada nos EUA e na Europa, não apenas pela sua beleza natural, mas também pelas suas propriedades médicas reportadas, que incluem estimulação do sistema imunológico e atividade antimicrobiana.

Posto isto, o objetivo foi averiguar a potencialidade de dois extratos de *Echinacea purpurea*, Infusão Aquosa (IA) e extrato Hidroalcoólico (HA), para serem utilizados como ingredientes ativos na formulação de produtos cosméticos. Para tal, a metodologia aplicada centrou-se na caracterização da bioatividade dos extratos. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo ensaio de microdiluição contra microrganismos incluídos no *Challenge Test* de cosméticos (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*), bem como microrganismos que fazem parte da microbiota da pele (*S. epidermidis*, *C. amycolatum*). As atividades antioxidante e citotóxica foram determinadas pelo ensaio de redução DPPH e pelo ensaio MTT numa linha celular de fibroblastos de pele de ratinho (NIH / 3T3; ATCC CRL-1658), respetivamente.

Os resultados obtidos revelaram que os extratos de *Echinacea purpurea*, principalmente o extrato HA, por apresentar atividade antifúngica, modesta atividade antioxidante e biocompatibilidade celular, em concentrações específicas, pode ter potencial como ingrediente conservante (adjuvante) e antioxidante em produtos cosméticos. No entanto, este estudo constituiu uma avaliação primária ao potencial destes extratos enquanto ingredientes cosméticos, pelo que, futuramente, devem desenvolver-se estudos que incluam outras avaliações tanto de eficácia como de segurança.

No que diz respeito ao segundo capítulo, este é alusivo ao estágio em farmácia comunitária, realizado na Farmácia Social Mutualista Covilhanense, na cidade da Covilhã, que se revelou crucial para a minha formação enquanto futura farmacêutica. Este capítulo tem como objetivo descrever a experiência e aprendizagem que me foram transmitidas relativamente ao funcionamento e prática do dia-a-dia de uma farmácia comunitária.

Palavras-chave

Atividade Antimicrobiana; Atividade Antioxidante; Atividade Citotóxica; *Echinacea purpurea*; Farmácia Comunitária; Ingredientes; Produtos Cosméticos

Abstract

The present work is divided in two chapters that describe my professional experience to obtain the Master's degree in Pharmaceutical Sciences, presenting a research component, as well as an internship component carried out in Community Pharmacy.

The first chapter concerns the laboratory research component developed at the Health Sciences Research Center of the University of Beira Interior and is entitled “Bioactivity of *Echinacea purpurea* extracts, a potential cosmetic ingredient”.

The search for natural ingredients in cosmetic industry has increased due to their antimicrobial properties in the preservation of formulations, as well as their antioxidant potential, which may be interesting in anti-aging products. *Echinacea purpurea* is cultivated throughout the USA and Europe not only because of its natural beauty but also for its reported medical properties, which includes stimulation of immunologic system and antimicrobial activity.

Therefore, the goal was to investigate the potential of two extracts of *Echinacea purpurea*, Aqueous Infusion (AI) and Hydroalcoholic Extract (HA), as active ingredients in the formulation of cosmetic products. To do this, the applied methodology focused on the characterization of the extracts' bioactivity. The antimicrobial activity was determined by the microdilution test against microorganisms included in the Cosmetics Challenge Test (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans*, *A. brasiliensis*), as well as microorganisms that are part of the skin microbiota (*S. epidermidis*, *C. amycolatum*). Antioxidant and cytotoxic activities were determined by the DPPH reduction assay and the MTT assay on a rat skin fibroblast cell line (NIH/3T3; ATCC CRL-1658), respectively.

The results obtained revealed that *Echinacea purpurea* extracts, mainly the HA extract, for presenting antifungal activity, modest antioxidant activity and cellular biocompatibility, at specific concentrations, may have potential to be used as a preservative and antioxidant ingredient in cosmetic products. However, this study was a primary assessment of the potential of these extracts as cosmetic ingredients, so, in the future, studies should be carried out to include other assessments of both efficacy and safety.

With regard to the second chapter, this alludes to the internship in community pharmacy, held at the Farmácia Social Mutualista Covilhanense, in the city of Covilhã, which proved to be crucial for my training as a future pharmacist. The purpose of this chapter is to describe the experience and learning that I have been given regarding the day-to-day functioning and practice of a community pharmacy.

Keywords

Antimicrobial Activity; Antioxidant Activity; Community Pharmacy; Cosmetic Products; Cytotoxic Activity; *Echinacea purpurea*; Ingredients

Índice

CAPÍTULO 1 - BIOATIVIDADE DE EXTRATOS DE *ECHINACEA PURPUREA*, UM POTENCIAL INGREDIENTE COSMÉTICO1

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Cosméticos.....	1
1.1.1. Aspetos Regulamentares dos Cosméticos.....	1
1.1.2. Formulação de Cosméticos	2
1.1.2.1. Preservação Cosmética	2
1.1.2.2. Antioxidantes na Cosmética.....	3
1.2. <i>Echinacea purpurea</i>	5
1.2.1. Usos Tradicionais	5
1.2.2. Extratos.....	6
1.2.3. Caracterização Fitoquímica	6
1.2.4. Atividade Biológica	6
1.2.4.1. Atividade Antimicrobiana	6
1.2.4.2. Atividade Antioxidante	7
1.2.4.3. Atividade Citotóxica.....	7
1.2.4.4. Atividade Imunoestimulante e Anti-Inflamatória.....	7
2. OBJETIVO GERAL.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS	8
3.1. Caracterização Fitoquímica.....	8
3.2. Atividade Antimicrobiana	9
3.2.1. Estirpes	9
3.2.2. Preparação do Inóculo	10
3.2.3. Preparação e Inoculação da Placa de 96 Poços	11
3.2.4. Leitura das Absorvâncias.....	11
3.2.5. Esquema Representativo da Metodologia Aplicada	11
3.2.6. Tratamento de Resultados.....	13
3.3. Atividade Antioxidante	13
3.3.1. Reagentes.....	14
3.3.2. Avaliação da Capacidade Antioxidante da Amostra	14
3.3.3. Determinação do EC50.....	15
3.3.4. Esquema Representativo da Metodologia Aplicada	15
3.3.5. Tratamento dos Resultados	18

3.4.	Atividade Citotóxica.....	18
3.4.1.	Tratamento das Células e Preparação da Placa de 96 Poços.....	19
3.4.2.	Preparação dos Estímulos e Estimulação das Células.....	20
3.4.3.	Ensaio de MTT.....	21
3.4.4.	Esquema Representativo da Metodologia Aplicada.....	21
3.4.5.	Tratamento dos Resultados.....	24
4.	APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	24
4.1.	Caracterização Fitoquímica	25
4.2.	Atividade Antimicrobiana.....	27
4.3.	Atividade Antioxidante	31
4.4.	Atividade Citotóxica.....	35
5.	CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	37

CAPÍTULO 2 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA . 39

1.	INTRODUÇÃO.....	39
2.	CARACTERIZAÇÃO E ORGANIZAÇÃO DA FARMÁCIA SOCIAL MUTUALISTA COVILHANENSE.....	39
2.1.	Contextualização, Localização e Horário de Funcionamento.....	39
2.2.	Espaço Físico.....	40
2.2.1.	Espaço Exterior	40
2.2.2.	Espaço Interior	40
2.3.	Recursos Humanos	42
2.4.	Equipamentos e Sistema Informático	43
3.	INFORMAÇÃO E DOCUMENTAÇÃO CIENTÍFICA	44
4.	APROVISIONAMENTO E ARMAZENAMENTO	44
4.1.	Aquisição e Encomendas	44
4.2.	Receção de Encomendas e Armazenamento	45
4.3.	Devoluções e Reclamações.....	46
4.4.	Controlo dos Prazos de Validade	47
5.	INTERAÇÃO FARMACÊUTICO-UTENTE-MEDICAMENTOS.....	47
5.1.	Atendimento ao Público.....	47
5.2.	Farmacovigilância.....	48
5.3.	VALORMED – Reciclagem de Medicamentos	49
6.	DISPENSA DE MEDICAMENTOS	49
6.1.	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica.....	50
6.1.1.	Receita Médica	50

6.1.1.1.	Validação da Receita.....	50
6.1.1.2.	Processamento da Receita	52
6.1.1.3.	Dispensa do Medicamento/Produto Prescrito	52
6.1.2.	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica Especial	53
6.1.3.	Regimes de Comparticipação	53
6.1.4.	Operação Luz Verde.....	54
6.2.	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica	55
6.2.1.	Automedicação e Aconselhamento Farmacêutico.....	55
7.	ACONSELHAMENTO E DISPENSA DE OUTROS PRODUTOS DE SAÚDE	56
7.1.	Produtos de Dermofarmácia, Cosmética e Higiene	56
7.2.	Produtos Dietéticos para Alimentação Especial	56
7.3.	Produtos Dietéticos Infantis	57
7.4.	Fitoterapia e Suplementos Nutricionais	57
7.5.	Medicamentos de Uso Veterinário.....	58
7.6.	Dispositivos Médicos.....	58
8.	PREPARAÇÃO DE MEDICAMENTOS.....	59
8.1.	Medicamentos Manipulados.....	59
9.	OUTROS CUIDADOS DE SAÚDE	59
9.1.	Preparação e Distribuição de Medicação a Instituições	59
9.2.	Entrega de Medicamentos ao Domicílio	60
10.	CONTABILIDADE E GESTÃO	60
10.1.	Conferência do Receituário e Faturação	60
11.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
	ANEXOS.....	71
	Anexo 1- Panfleto informativo sobre a correta administração de insulina.	71

Lista de Figuras

Figura 1 – Fotografia da planta <i>Echinacea purpurea</i>	5
Figura 2 - Esquema representativo da metodologia aplicada na execução dos testes de suscetibilidade antimicrobiana em bactérias e fungos, para avaliação da atividade antimicrobiana.	12
Figura 3 - Esquema representativo da metodologia aplicada na execução do ensaio de redução do DPPH para avaliação da atividade antioxidante.	17
Figura 4 – Esquema representativo da metodologia aplicada na execução do ensaio MTT para avaliação da atividade citotóxica.....	22
Figura 5 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT	23
Figura 6 – Representação gráfica da percentagem de crescimento bacteriano e fúngico, após exposição, de respetivamente 24h ou 48h, a diferentes concentrações (%v/v) de <i>Echinacea Purpurea</i> IA e HA.....	28
Figura 7 - Representação gráfica da reta de calibração DPPH.....	31
Figura 8 – Representação gráfica do perfil antioxidante do Ácido Ascórbico.....	31
Figura 9 - Representação gráfica do perfil antioxidante da <i>Echinacea purpurea</i> IA.....	32
Figura 10 - Representação gráfica do perfil antioxidante da <i>Echinacea purpurea</i> HA ...	32
Figura 11 - Representação gráfica da percentagem de redução do MTT, representativa da viabilidade celular de células 3T3, após uma exposição de 24h a diferentes concentrações (%v/v) de <i>Echinacea purpurea</i> IA e HA.	35

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estirpes, bacterianas e fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana.	9
Tabela 2 - Caracterização fitoquímica da <i>Echinacea purpurea</i> IA e HA por HPLC.....	25
Tabela 3 – Concentração Mínima Inibitória visual (%v/v) da <i>C. albicans</i> para a <i>E. purpurea</i> IA e HA.....	27
Tabela 4 - Valores obtidos de EC ₅₀ (µg/ml) para o padrão controlo de Ácido Ascórbico.	31
Tabela 5 - Valores obtidos de EC ₅₀ (%) e IAA para a <i>Echinacea purpurea</i> IA e HA.	33

Lista de Acrónimos

AFP	Associação de Farmácias de Portugal
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
ARS	Administração Regional de Saúde
ASMMC	Associação de Socorros Mútuos Mutualista Covilhanense
BDNP	Base de Dados Nacional de Prescrições
BPF	Boas Práticas Farmacêuticas
CBP-BI	Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior
CE	Comissão Europeia
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DCI	Denominação Comum Internacional
DGAV	Direção Geral de Alimentação e Veterinária
DGS	Direção Geral da Saúde
DM	Dispositivos Médicos
DP	Desvio Padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FBS	Soro Bovino Fetal
FC	Farmácia Comunitária
FSMC	Farmácia Social Mutualista Covilhanense
HA	Extrato Hidroalcoólico de <i>E. purpurea</i>
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IA	Extrato Infusão Aquosa de <i>E. purpurea</i>
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
ISO	International Standard Organization
IVA	Imposto sobre o Valor Acrescentado
LVMNSRM	Local de Venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MEP	Medicamentos Estupefacientes e Psicotrópicos
MHB	Muller-Hinton Broth
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MNSRM-EF	MNSRM de Dispensa Exclusiva em Farmácia
MSRM	Medicamento Sujeito a Receita Médica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MUV	Medicamentos de Uso Veterinário
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PIM	Preparação Individualizada da Medicação
PVF	Preço de Venda à Farmácia
PVP	Preço de Venda ao Público
RAM	Reação Adversa Medicamentosa
RCM	Resumo das Características do Medicamento
SCCS	Scientific Committee on Consumer Safety
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio

SNS	Sistema Nacional de Saúde
SPMS	Serviços Partilhados do Ministério da Saúde
TSA	Trypticase Soy Agar
UE	União Europeia

Capítulo 1 - Bioatividade de extratos de *Echinacea purpurea*, um potencial ingrediente cosmético

1. Introdução

1.1. Produtos Cosméticos

O termo “cosmético” derivada da palavra grega "*kosm tikos*" que significa “ter o poder, organizar, habilidade na decoração”. Desde os tempos mais antigos que o homem se preocupa com o seu bem estar físico, o qual passa em muito pela aparência que apresenta. Além disso, procura produtos que sejam seguros, naturais e que se enquadrem num estilo de vida saudável, daí a popularidade dos cosméticos com ingredientes naturais [1]–[3].

Na sociedade atual, a utilização de ingredientes de origem natural continua a ser uma tendência crescente. Nos últimos anos o mercado dos “cosméticos naturais” tem estado em constante expansão, com um crescimento anual de 10 a 11% [4]. A aposta neste nicho de mercado representa uma oportunidade para a indústria cosmética, uma vez que cada vez mais, o consumidor está disposto a pagar mais por estes produtos, muito por influência da internet e das redes sociais [4], [5].

A popularidade dos cosméticos à base de plantas, entre os consumidores, justifica-se pela crescente consciencialização relativamente à saúde e segurança pessoais, esperando produtos cosméticos mais seguros, livres de compostos químicos sintéticos com potencial danoso, sem que isso comprometa a eficácia e qualidade dos mesmos [1], [6]. Esta maior aceitabilidade dos cosméticos à base de plantas deve-se à segurança aparente que estes apresentam e que se reflete numa maior biocompatibilidade e, conseqüentemente, numa baixa ocorrência de efeitos secundários [1]. Para além disso, têm como vantagens a relação custo-benefício, a facilidade de acesso na natureza, a experiência tradicional da sua utilização e o facto de poderem desempenhar várias funções numa única formulação cosmética [1], [6]. Dentro destas funções, podem atuar como ingredientes ativos, excipientes, aditivos, entre outras [6].

Neste contexto, a fiabilidade dos cosméticos à base de plantas incentiva a testar diferentes plantas e os seus extratos de modo a perceber o seu potencial como ingredientes naturais na formulação cosmética.

1.1.1. Aspetos Regulamentares dos Cosméticos

Com a industrialização e o rápido aparecimento de novos ingredientes utilizados nos cosméticos, foram elaboradas várias diretivas e regulamentos, a fim de controlar a utilização destes ingredientes, garantir a segurança dos consumidores, determinar as responsabilidades e permitir reclamações de reações adversas. Entre os regulamentos recomendados a nível mundial, apenas três representam os principais mercados cosméticos, nomeadamente os Estados Unidos, a União Europeia e o Japão [2].

Na União Europeia (UE), o Regulamento da Comissão Europeia (CE) n.º 1223/2009 relativo aos produtos cosméticos é o principal quadro regulamentar dos produtos

cosméticos acabados, quando colocados neste mercado. Este define um produto cosmético como “qualquer substância ou mistura destinada a ser colocada em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistema capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as membranas mucosas da cavidade oral com vista exclusiva ou principalmente à sua limpeza, perfumando-os, mudando a sua aparência, protegendo-os, mantendo-os em boas condições, ou corrigindo odores corporais” [7].

O regulamento substitui a Diretiva 76/768/CE, adotada em 1976, fortalecendo a segurança dos produtos cosméticos e simplificando a estrutura para todos os operadores do setor. Fornece um regime robusto e reconhecido internacionalmente, levando em consideração os mais recentes desenvolvimentos tecnológicos. O documento “Notas de orientação para o teste de ingredientes cosméticos e avaliação da sua segurança, 11.^a revisão” compila todos os testes e processos necessários para avaliar a segurança de ingredientes cosméticos na União Europeia e foi publicado pelo *Scientific Committee on Consumer Safety* (SCCS), com o objetivo de orientar a indústria cosmética e as autoridades públicas no sentido de melhorar a harmonização e conformidade com a atual legislação cosmética da EU [8].

Em Portugal, após o início da comercialização destes produtos, estes são controlados pelo INFARMED, autoridade nacional competente para tal fiscalização.

1.1.2. Formulação de Cosméticos

1.1.2.1. Preservação Cosmética

Os cosméticos, como qualquer produto que contenha água e compostos orgânicos/inorgânicos, são um meio rico em nutrientes que favorece o crescimento de microrganismos, o que exige uma especial preocupação com a preservação contra a contaminação microbiana para garantir a segurança do consumidor e aumentar o seu prazo de validade [2]. Tendo isto em conta, a indústria cosmética arranhou estratégias para garantir a preservação dos seus produtos. A estratégia de preservação primária ocorre durante o fabrico e baseia-se na aplicação de boas práticas de fabrico, certificadas pela ISO 22716:207 – Boas Práticas de Fabricação para Cosméticos [9]. A preservação secundária, que ocorre após o fabrico, utiliza formas químicas, físicas ou físico-químicas para alcançar uma proteção eficiente, incluindo a adição de ingredientes com propriedades conservantes [2].

Em termos regulamentares, um conservante é uma substância de origem natural ou sintética destinada a inibir o desenvolvimento de microrganismos, encontrando-se listados no Anexo V “Lista dos Conservantes Autorizados nos Produtos Cosméticos” do Regulamento Europeu n.º 1223/2009 [7]. Esta inibição deve ser eficaz num espectro de atividade alargado e deve ter uma duração mais longa do que o próprio produto cosmético, sendo equivalente ao prazo de validade esperado mais o tempo de utilização. Além disso, a atividade antimicrobiana deve ser suficientemente eficaz para evitar o ganho de adaptação e resistência do microrganismo ao sistema de conservantes, o qual deve ser testado relativamente à sua eficácia através de metodologias adequadas, incluindo a *Challenge Test*. Este ensaio envolve a inoculação do produto cosmético com quantidades conhecidas de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) com o objetivo de avaliar a sua resistência à contaminação microbiana refletindo, desta forma, a eficácia do sistema conservante e se este se adequa ao período de validade do produto [2].

O SCCS, assim como outras comissões europeias, testam regularmente a segurança dos conservantes químicos sintéticos listados no Anexo V, resultando tanto na edição dos limites não tóxicos já estabelecidos como na sua reclassificação, podendo alguns, inclusive, passar para a lista das substâncias proibidas em produtos cosméticos, incluída no Anexo II do Regulamento Europeu n.º 1223/2009 [2], [7].

Os conservantes sintéticos utilizados ao longo de décadas como os parabenos e o fenoxietanol, apresentam muitos benefícios, incluindo, o seu preço mais acessível, a sua ampla atividade contra bactérias e fungos, a sua compatibilidade com outros ingredientes, e o facto de geralmente não interferirem com fragrância, cor ou outros aspetos de uma formulação [6]. Embora a eficácia antimicrobiana seja considerada a função principal de um conservante cosmético e os sintéticos comuns desempenhem esse papel na perfeição, aumentando o tempo de vida dos produtos e ajudando a mantê-los livres de microrganismos, a toxicidade inerente a estes ingredientes é um problema com o qual a indústria cosmética deve preocupar-se. Muitos destes conservantes têm desenvolvido uma reputação negativa e a sua utilização tornou-se cada vez mais controversa nos últimos anos [6], [10]. De uma forma geral têm sido procuradas estratégias de formulação que permitam reduzir a utilização de conservantes utilizando substâncias que, de alguma forma, potenciam a ação dos conservantes e têm bom perfil de segurança (frequentemente conhecidos como *boosters*).

Na sequência das controvérsias sobre os conservantes sintéticos, a indústria cosmética encontra-se sob uma pressão acrescida para a procura de alternativas naturais, uma vez que a seleção dos conservantes naturais já disponíveis é bastante limitada [6]. Com efeito, a utilização de ingredientes naturais com propriedades conservantes tem sido explorada pela indústria cosmética no sentido de disponibilizar ao consumidor uma alternativa segura, com potencial para alegar a isenção de conservantes dos seus produtos, uma vez que estes novos ingredientes naturais não se enquadram na legislação e não constam, por conseguinte, entre os conservantes do anexo V do Regulamento (CE), proporcionando assim um ângulo bastante positivo de marketing. Contudo, esta estratégia tem sido mal recebida por Entidades Reguladoras (como o INFARMED) uma vez que a conservação dos cosméticos é legislada pelo anexo V do referido documento e a utilização de moléculas alternativas para a sua substituição integral é considerada ilegal. Estas substâncias podem, contudo, ser utilizadas para potenciar o efeito do sistema conservante.

Além disso, se o ingrediente natural em causa acrescentar à sua contribuição para ação conservante uma outra propriedade interessante, como por exemplo, o efeito antioxidante, as oportunidades de comunicação de marketing tornar-se-ão ainda maiores [6].

1.1.2.2. Antioxidantes na Cosmética

O envelhecimento da pele é um processo complexo determinado pela formação de radicais livres, tanto a nível intrínseco como a nível extrínseco. O envelhecimento intrínseco correlaciona-se com a produção natural de radicais livres ao longo dos anos, estando dependente de fatores fisiológicos e genéticos. O envelhecimento extrínseco, ou envelhecimento ambiental, deve-se a fatores exógenos que promovem a formação dos radicais livres como a exposição à radiação UV (considerada o fator mais preponderante para o envelhecimento extrínseco), tabagismo, consumo excessivo de álcool, poluição atmosférica, má nutrição, bem como privação do sono, stress ou utilização inadequada de

cosméticos [11]. No entanto, ambos os processos ocorrem em simultâneo e têm resultados sinérgicos [12].

Os radicais livres são moléculas extremamente instáveis e reativas que possuem um elétron livre na camada orbital mais externa e que procuram oxidar rapidamente biomoléculas, com o objetivo de alcançar a sua estabilidade, podendo danificar DNA, proteínas, membranas celulares, entre outros componentes biológicos [13].

O organismo humano possui mecanismos endógenos de defesa, tais como certas enzimas e moléculas antioxidantes que têm a capacidade de reduzir e, conseqüentemente, neutralizar os radicais livres. No entanto, como parte do processo natural de envelhecimento, a eficácia deste sistema de defesa diminui consideravelmente, enquanto a produção de espécies reativas de oxigênio aumenta, resultando num envelhecimento acelerado da pele. Para além disso, a exposição à radiação UV é um fator preponderante que contribui para a celeridade do processo, uma vez que, esta tem a capacidade de inibir alguns destes mecanismos de defesa [13].

Tendo em conta o mecanismo pelo qual ocorre o envelhecimento da pele, seria de esperar que antioxidantes de aplicação tópica contribuíssem para a neutralização dos radicais livres produzidos e, com isso, a manutenção da juventude da pele por mais tempo. Neste contexto, a indústria cosmética começou a produzir e comercializar produtos com ação antioxidante tópica que têm a capacidade tanto de prevenir como melhorar o aspeto dos sinais de envelhecimento da pele.

A concorrência, em conjunto com a necessidade de satisfazer as preferências e expectativas por parte dos consumidores, exige à indústria da cosmética que permaneça em constante desenvolvimento e reformulação dos seus produtos. Embora a indústria seja orientada pela ciência e altamente inovadora, a inovação parece não estar a ser suficiente no que toca a ingredientes antioxidantes [12].

No mercado atual, os ingredientes antioxidantes com maior uso em produtos cosméticos contra o envelhecimento da pele são a vitamina A (retinol), a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E (tocoferol), os carotenoides, a coenzima Q10 e os compostos fenólicos [12], [14]. Uma vez que, alguns destes têm origem vegetal sendo produzidos por inúmeras plantas, os extratos derivados das plantas que os produzem podem ter potencialidade como ingredientes ativos na formulação de produtos cosméticos.

1.2. *Echinacea purpurea*

O género *Echinacea* é nativo da América do Norte e pertence à família *Asteraceae* (anteriormente denominada por *Compositae*). Este género é vulgarmente conhecido por “coneflower” e inclui um grupo de nove espécies diferentes, nomeadamente, *E. purpurea*, *Echinacea laevigata* (C.L. Boynton & Beadle) S.F. Blake, *Echinacea paradoxa* Britton, *Echinacea atrorubens* (Nutt.) Nutt., *E. angustifolia*, *Echinacea tennesseensis* (Beadle) Small, *Echinacea sanguinea* Nutt., *E. pallida* (Nutt.) Nutt., e *Echinacea simulata* McGregor [15], [16].

Entre as espécies deste género, a *E. purpurea* é uma das plantas medicinais mais importantes e conhecidas do mundo devido às suas atividades biológicas promissoras [17], possuindo um elevado cultivo por todos os Estados Unidos da América, Canadá e Europa, em particular, na Alemanha [15], [18].

Em relação à sua morfologia, a *E. purpurea* possui um caule que pode ir até 2 metros de altura. Para além disso, esta espécie caracteriza-se pelas suas flores espinhosas em forma de cone laranja-avermelhadas rodeadas por pétalas arroxeadas [15].

As sementes de *E. purpurea* germinam em 10 - 20 dias e as suas plantas florescem em 90 - 120 dias, preferindo um lugar de cultivo com solo arenoso ou argiloso, que possua uma boa luz solar e um substrato húmido com pH normal a alcalino [3], [15].

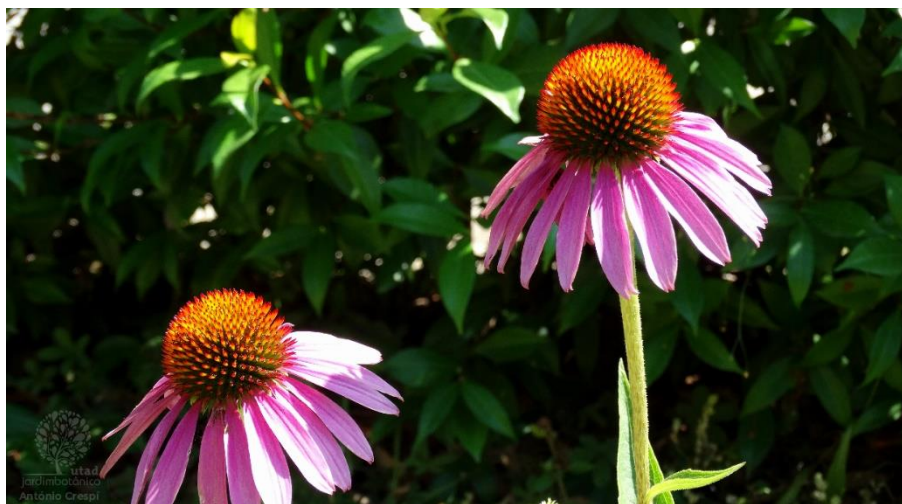


Figura 1 – Fotografia da planta *Echinacea purpurea*.
(Crespí A. Jardim Botânico UTAD, reproduzida ao abrigo da licença CC BY-NC 4.0.)

1.2.1. Usos Tradicionais

Tradicionalmente, curandeiros indígenas das tribos nativas da América do Norte utilizavam diferentes preparações das diferentes espécies de *Echinacea* com diferentes aplicabilidades, como alívio da dor, condições inflamatórias, tratamento de feridas, antídoto contra vários venenos, doenças infecciosas, entre outros [15], [19], [20]. Adicionalmente, estes extratos são também usados para melhorar o sistema imunológico e para tratar sintomas respiratórios causados por infeções bacterianas e virais (gripe, dores de garganta, tosse) [15], [21], [22]. Na medicina tradicional chinesa, por exemplo, *E. purpurea* é chamada de *Song Guo Ju* e é utilizada para prevenir e tratar infeções do trato respiratório [15], [23].

1.2.2. Extratos

O género *Echinacea*, tal como as suas espécies, são bastante conhecidas devido às suas propriedades medicinais, que se devem principalmente aos componentes químicos que fazem parte da sua constituição. Assim, têm sido desenvolvidos diferentes tipos de extratos, da parte aérea, das raízes ou ambos, e por diferentes métodos de extração (extração em fase sólida, extração por solvente, extração supercrítica, destilação) [15]. Para além disso, estes componentes têm vindo a ser analisados, nomeadamente em relação à sua estrutura química e propriedades biológicas. A análise dos componentes é maioritariamente efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa acoplada a diferentes detetores, como espectrofotometria de UV, colorimetria eletroquímica e espectrometria de massa de ionização por eletropulverização [17].

1.2.3. Caracterização Fitoquímica

As espécies de *Echinacea* têm demonstrado possuir uma composição química bastante complexa e diversificada. Os principais componentes químicos mais estudados são os derivados do ácido cafeico, alquilamidas e polissacarídeos [15], [17]. Existem ainda outros compostos como alcaloides, amidas e flavonoides (quercetina, caempferol, isoramnetina e os seus ácidos fenólicos livres) [15], [17], [24]. As diferentes espécies de *Echinacea* incluem ainda elementos inorgânicos como o potássio, cálcio, magnésio, ferro (III), sulfato de alumínio, entre outros [15].

A composição química apresenta uma grande variabilidade devido a fatores genéticos inerentes da planta e dos seus órgãos (folhas, flores, caules ou raízes), fatores climáticos, contaminantes, condições de secagem e armazenamento, tal como o tipo de extração utilizado [15]. É exemplo da existência desta variabilidade o facto de as partes aéreas possuírem em maior número alquilamidas, derivados do ácido cafeico, polissacarídeos e glicoproteínas, enquanto que as raízes contêm componentes mais voláteis e alcaloides [15], [25], [26].

1.2.4. Atividade Biológica

Como foi referido anteriormente, os extratos de *Echinacea*, incluindo os extratos de *E. purpurea*, são bastante utilizados devido às suas atividades biológicas com benefício para a saúde humana, nomeadamente a sua atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, entre outras [15], [26].

1.2.4.1. Atividade Antimicrobiana

Uma das características principais da espécie *E. purpurea* é a sua atividade antimicrobiana, o que possibilita a sua utilização na prevenção e tratamento de diferentes infeções bacterianas. Assim, encontra-se já descrito a capacidade deste extrato de inibir o crescimento de diferentes microrganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre outros [15], [26]–[28].

A *E. purpurea* é considerada seletiva quanto à sua atividade antimicrobiana, uma vez que parece ter diferentes padrões de sensibilidade e níveis de eficácia para diferentes

microrganismos, assim como, respostas dependentes do tipo de extrato utilizado [29] [30], [31].

1.2.4.2. Atividade Antioxidante

Os compostos fenólicos, principalmente os derivados do ácido cafeico, são os principais potenciais componentes ativos responsáveis pelo poder antioxidante de *E. purpurea*. Estes compostos podem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio, inibidores de oxigénio e como agentes quelantes de metais [15].

De entre os derivados do ácido cafeico, o ácido chicórico está bastante relacionado com a capacidade de eliminação dos radicais livres dos extratos [17], [32]. As alquilamidas presentes no extrato são ainda capazes de aumentar a atividade deste ácido, embora não possuam atividade antioxidante. O aumento desta atividade deve-se a dois possíveis mecanismos: i) a sua atividade de superfície que vai possibilitar que o ácido chicórico tenha um melhor acesso para inibir a oxidação lipídica; ii) a regeneração do ácido chicórico pela doação de hidrogénio [17], [33].

1.2.4.3. Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica de diferentes extratos da *E. purpurea* foi estudada para várias células cancerígenas humanas, entre elas: CaCo-2), HCT-116 e HCT-15 (células epiteliais de cancro colorretal) [34], [35]; HeLa (células epiteliais de cancro do cérvix) [28], [35], [36]; MCF-7 (células epiteliais de cancro da mama) [35], [36]; NCI-H460 (células epiteliais de cancro do pulmão) e HepG2 (células epiteliais de cancro do fígado) [36]. A *E. purpurea* demonstrou ser citotóxica contra as células estudadas, estando a atividade dependente tanto do tempo como da dose e tipo de extrato a que as células são expostas.

1.2.4.4. Atividade Imunoestimulante e Anti-Inflamatória

A planta *E. purpurea* é também muito conhecida e usada devido à sua atividade imunoestimulante e anti-inflamatória. Estudos na literatura comprovam que a administração de *E. purpurea* aumenta a imunidade inata e fortalece o sistema imunológico através da ativação de neutrófilos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e células natural killer [17], [37], [38]. Assim, a planta ou os extratos da mesma são responsáveis por três mecanismos envolventes nesta atividade, através da ativação da fagocitose, estimulação de fibroblastos e ainda, aumento da atividade respiratória que, conseqüentemente, leva a aumento da mobilidade leucocitária [17], [37], [38].

2. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho de investigação foi averiguar a potencialidade de dois extratos de *Echinacea purpurea*, Infusão Aquosa (IA) e extrato Hidroalcoólico (HA), como ingredientes ativos na formulação de produtos cosméticos. Para tal, a metodologia aplicada centrou-se na caracterização da bioatividade dos extratos, com a determinação *in vitro* das suas capacidades antimicrobiana, antioxidante e citotóxica.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização Fitoquímica

A mix de extrato sólido de *Echinacea Purpurea*, que corresponde às partes aéreas da planta incluindo troços de caule, folhas e inflorescências, foi adquirida à empresa Ervas da Zoé®, que desde 2008 se dedica à produção em modo biológico de ervas aromáticas e condimentares na região de Idanha-a-Nova. A partir da mix, obteve-se o extrato aquoso pelo método de extração por infusão (Massa de material vegetal pesado = 4,06 g; Volume de água destilada = 100 mL; Massa do extrato = 0,98 g), constituindo, assim, o extrato denominado Infusão Aquosa (IA), testado ao longo deste trabalho. O extrato Hidroalcoólico (HA), obteve-se pelo método de extração hidroetanólica (Massa de material vegetal pesado = 5,26 g; Volume de solução = 100 mL; Massa do extrato = 0,44 g).

A caracterização fitoquímica tem por objetivo determinar os componentes químicos dos extratos *Echinacea purpurea* IA e HA em estudo, a fim de entender melhor as suas propriedades bioativas e as suas aplicações.

A realização da caracterização fitoquímica dos extratos ficou ao encargo do Centro de Biotecnologia de Plantas da Beira Interior (CBP-BI) do Instituto Politécnico de Castelo Branco, que utilizou o método da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a um detetor *Diode Array*.

A separação dos compostos foi conseguida através de uma coluna YMC-Triart PFP (150 m × 4,6 mm, D.S 5 µm, 12 nm) utilizando-se uma pré-coluna Triart PFP (10 × 3.0 mm I.D., S-5 µm, 12 nm) e um *guard-c-holder* Art-Nr XPGCH-Q1 (10 × 1-4.0 mm I.D.). A fase móvel consistia em um solvente A (acetoneitrilo) e um solvente B (0,1% TFA/água) com um fluxo corrente a 1 mL/min.

- **Extrato Infusão Aquosa**

A amostra de IA foi injetada com uma concentração de 20 mg/mL (50 µL). A temperatura da coluna foi definida a 40 °C. O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: inicialmente 10% A e 90% B em 3min, 15% A e 85% B dos 15-25 min, 18% A e 82% B dos 25-45min, 30% A e 70% B dos 45-50min, 42% A e 58% B dos 50-54min, 50% A e 50% B dos 54-55min, depois 100% A e 0% de B dos 55-60min e por fim 10% A e 90% B nos 60min.

- **Extrato Hidroalcoólico**

A amostra de HA foi injetada com uma concentração de 35,2 mg/mL (50 µL). A temperatura da coluna foi definida a 40 °C. O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: inicialmente 10% A e 90% B em 3min, 15% A e 85% B dos 15-25 min, 18% A e 82% B dos 25-45min, 30% A e 70% B dos 45-50min, 42% A e 58% B dos 50-54min, 50% A e 50% B dos 54-55min, depois 100% A e 0% de B dos 55-60min e por fim 10% A e 90% B nos 60min.

3.2. Atividade Antimicrobiana

O ensaio de suscetibilidade antimicrobiana através do método de microdiluição em caldo, tem como objetivo determinar a concentração mínima inibitória (CMI). A CMI corresponde à mais baixa concentração do composto, em meio de cultura, que inibe o crescimento visível dos microrganismos em estudo.

O crescimento microbiano nos poços é visível a olho nu, através da turvação do meio e tendo em conta os controlos positivos (o microrganismo é inoculado em meio de cultura, prevendo o crescimento máximo do mesmo nestas condições) e os controlos negativos (apenas meio de cultura, como controlo de esterilidade do meio).

Este é um método simples, eficaz e barato, que permite determinar, num curto espaço de tempo, o efeito que a amostra em estudo tem no crescimento microbiano. A metodologia aplicada foi adaptada das normas do CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*) M7 para as bactérias aeróbias, M27 para as leveduras e M38 para os fungos filamentosos [39]–[41].

3.2.1. Estirpes

A análise da atividade antimicrobiana compreendeu microrganismos incluídos no *Challenge Test* da ISO 11930:2019 *Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*, que avalia a eficácia e estabilidade do sistema conservante em produtos cosméticos [42]. Especificamente, incluíram-se *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404, uma vez que uma contaminação cosmética pelos microrganismos em questão poderia originar consequentemente uma infeção da pele ou doença respiratória. Para além destes, foram também incluídos microrganismos que fazem parte da microbiota da pele, nomeadamente, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 178970 e *Corynebacterium amycolatum* ATCC 49368. A informação relativamente às espécies utilizadas, encontra-se resumida na Tabela 1.

Tabela 1 - Estirpes, bacterianas e fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana.

	Espécie	Estirpe	Classificação	Challenge Test	Microbiota da Pele
BACTÉRIAS	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram Positivas	×	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 178970		×	
	<i>Corynebacterium amycolatum</i>	ATCC 49368		×	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Gram Negativas	×	
	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739		×	
FUNGOS	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levedura	×	
	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404	Fungo Filamentoso	×	

3.2.2. Preparação do Inóculo

- **Bactérias**

O procedimento experimental iniciou com a repicagem da estirpe bacteriana a testar em meio de cultura sólido *Trypticase Soy Agar* (TSA), que de seguida foi incubado durante 24h a 37°C.

Findo o período de incubação, selecionou-se, pelo menos, de 3 a 5 colónias, bem isoladas e do mesmo tipo morfológico, que foram suspensas em solução salina estéril (NaCl) a 0,85 % e a densidade ótica foi acertada a 0,5 MacFarland, correspondente a aproximadamente $1-2 \times 10^8$ células por mL de suspensão.

Depois de homogeneizada, a suspensão obtida sofreu uma diluição 1:100, através da adição de 50 µL a 4,950 µL de meio de cultura líquido *Muller-Hinton Broth* (MHB), constituindo, assim, a solução de trabalho do inóculo.

O mesmo procedimento foi aplicado para cada estirpe bacteriana em estudo.

- **Levedura**

À semelhança do que foi feito para as bactérias, também no caso da levedura foi necessário fazer um pré-inóculo, repicando a estirpe de *C. albicans* a testar em meio de cultura sólido *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) e incubando durante 24h a 37°C.

Findo o período de incubação, as colónias selecionadas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl) a 0,85 % e a densidade ótica foi acertada a 0,5 MacFarland, correspondente a aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células por mL de suspensão.

Depois de homogeneizada, a suspensão obtida sofreu uma diluição 1:50, através da adição de 10 µL a 490 µL de meio de cultura líquido RPMI-1640, seguida de uma segunda diluição 1:20, adicionando 100 µL da diluição anterior a 1900 µL de meio de cultura líquido RPMI-1640, constituindo-se, assim, a solução de trabalho do inóculo.

- **Fungo Filamentoso**

Um pré-inóculo em meio de cultura sólido SDA foi feito repicando a estirpe de *A. brasiliensis* a testar e incubado durante 7 dias a 35 °C.

Findo o período de incubação, as colónias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de solução salina estéril (NaCl) a 0,85 % e, com o auxílio de uma ansa, raspadas. A mistura resultante foi pipetada para um tubo *ependorf*, que foi colocado a repousar até que ocorresse separação de fases entre a suspensão homogénea superior e o depósito de estruturas maiores no fundo. De seguida, foram retirados 300 µL do sobrenadante e adicionados a 2700 µL de meio de cultura líquido RPMI-1640. A densidade ótica da suspensão resultante foi lida num espectrofotómetro a 530 nm e acertada de forma a variar entre 0,09 e 0,11 (transmitância de 80% a 82%). Desta suspensão, realizou-se uma diluição 1:50, adicionando 160 µL a 7840 µL de meio de cultura líquido RPMI-1640, constituindo-se, assim, a solução de trabalho do inóculo.

3.2.3. Preparação e Inoculação da Placa de 96 Poços

Por cada ensaio realizado, foram inoculadas duas placas de 96 poços para as bactérias, uma para cada extrato; uma placa para a levedura e uma placa para o fungo filamentoso, sendo que estas últimas comportaram ambos os extratos em estudo.

Nas placas de 96 poços, previamente esterilizadas em câmara de fluxo laminar, colocaram-se 200 µL da amostra a testar nos poços da linha A e 100 µL de meio de cultura líquido (MHB ou RPMI-1640, conforme a estirpe) nos restantes poços da placa. De seguida, realizaram-se diluições sucessivas 1:2 desde a linha A à linha F, pipetando 100 µL do poço anterior para o poço seguinte. O pipetado dos poços da linha F foi descartado. Desta forma, numa mesma coluna da placa, foi possível testar 6 concentrações diferentes dos respetivos extratos, sendo que a gama de concentrações do extrato IA compreendeu-se dos 50 a 1,56 (%v/v) e a do extrato HA dos 5 a 0,16 (%v/v).

Feitas as diluições, e de maneira a perfazer um volume final de 200 µL por poço, inocularam-se 100 µL das suspensões de trabalho preparadas nos poços das linhas A-G nas colunas correspondentes a cada estirpe, tendo em conta que o ensaio se realizou em duplicado para cada uma delas. Nos poços da linha H foram adicionados 100 µL de meio de cultura líquido (MHB ou RPMI-1640, conforme a estirpe).

Desta forma, os poços das linhas A-F correspondem a 100 µL das diluições do extrato em estudo inoculadas com 100 µL das suspensões de inóculos preparadas. Os poços da linha G são o controlo positivo, que comporta 100 µL de meio de cultura (MBH ou RPMI-1640, conforme a estirpe) e 100 µL de suspensão preparada para cada estirpe, com o intuito de representar a normal proliferação das mesmas. Os poços da linha H são o controlo negativo, constituídos somente por 200 µL de meio de cultura líquido (MBH ou RPMI-1640, conforme a estirpe), não sendo suposto haver qualquer crescimento microbiano nos mesmos, servindo assim de controlo de esterilidade dos meios de cultura líquidos.

3.2.4. Leitura das Absorvâncias

Após a inoculação das placas, foi feita de imediato a leitura das absorvâncias de cada poço a 600 nm num leitor de microplacas, correspondendo ao t_0h . De seguida, as placas foram colocadas a incubar a 37°C durante 24h, no caso das bactérias, e durante 48h, no caso da levedura. A placa do fungo filamentoso, foi incubada a 35°C durante 48h.

Findo o período de incubação de 24h, os poços das placas correspondentes às bactérias foram ressuspensos e procedeu-se a leitura das absorvâncias a 600 nm num leitor de microplacas, correspondendo ao t_{24h} . O mesmo procedimento repetiu-se às 48h de incubação, tanto para a placa da levedura como para a placa do fungo filamentoso, correspondendo ao t_{48h} .

3.2.5. Esquema Representativo da Metodologia Aplicada

A seguinte Figura 2 esquematiza a metodologia aplicada no ensaio de suscetibilidade antimicrobiana.

1 PREPARAÇÃO DO INÓCULO

BACTÉRIAS

1. Selecionar colônias da cultura em meio sólido TSA com 24h de crescimento a 37°C;
2. Suspender as colônias em NaCl a 0,85%;
3. Acertar a DO a 0,5 McFarland ($1-2 \times 10^8$ células/mL);
4. Diluição 1 : 100 com Meio MHB.

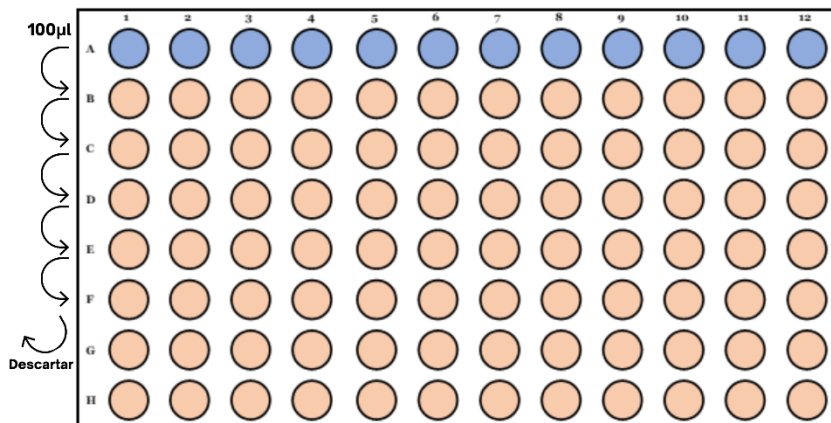
LEVEDURA

1. Selecionar colônias da cultura em meio sólido SDA com 24h de crescimento a 37°C;
2. Suspender as colônias em NaCl a 0,85%;
3. Acertar a DO a 0,5 McFarland ($1-5 \times 10^6$ células/mL);
4. Diluir 1 : 50 da suspensão com Meio RPMI;
5. Diluir novamente 1 : 20 com Meio RPMI.

FUNGO FILAMENTOSO

1. Pré-inóculo em meio sólido SDA com 7 dias de crescimento a 35°C;
2. Cobrir as colônias com 1ml de NaCl a 0,85% e raspar;
3. Pipetar a mistura e esperar que ocorra separação de fases;
4. Adicionar 300µl do sobrenadante a 2,7ml de Meio RPMI;
5. Acertar para 0,09 a 0,11 o valor de transmitância a 530nm;
6. Diluir 1 : 50 a suspensão anterior com Meio RPMI.

2 PREPARAÇÃO E INOCULAÇÃO DA PLACA DE 96 POÇOS

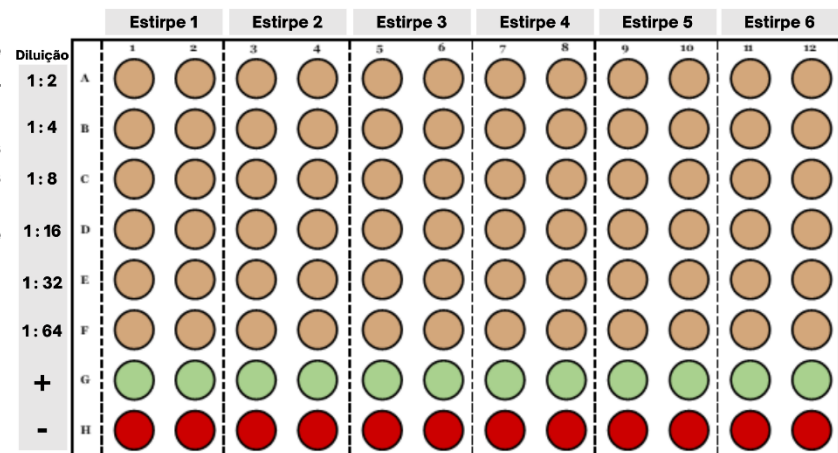


Legenda:

- 200µl de Extrato em estudo
- 100µl de Meio de Cultura

Feitas as diluições de 1 : 2 na placa e de modo a perfazer um volume final de 200µl por poço:

1. Adicionar 100µl de inóculo aos poços das linhas A - G nas filas correspondentes a cada estirpe;
2. Adicionar 100µl de meio de cultura aos poços da linha H;



Legenda:

- Extrato Diluído + Inóculo
- Controlo Positivo (Meio de Cultura + Inóculo)
- Controlo Negativo (Apenas Meio de Cultura)

3 LEITURA DAS ABSORVÂNCIAS

Após a inoculação da placa, ler as absorvâncias a 600nm correspondendo ao t0h.



Incubar a placa a 37°C durante 24h, no caso das bactérias, ou 48h, no caso da levedura, e 35°C durante 48h, no caso do fungo filamentoso.



Ressuspender todos os poços correspondentes às bactérias, e realizar a leitura das absorvâncias (600nm) às 24h (t24h).



Ressuspender todos os poços correspondentes à levedura/fungo filamentoso e realizar a leitura das absorvâncias (600nm) às 48h (t48h).

Figura 2 - Esquema elaborado no Canva® representativo da metodologia aplicada na execução dos testes de suscetibilidade antimicrobiana em bactérias e fungos, para avaliação da atividade antimicrobiana da *Echinacea purpurea* IA e HA.

3.2.6. Tratamento de Resultados

O presente trabalho contou com a realização de 4 ensaios independentes para cada extrato e estirpe em estudo. A validação dos resultados apenas é possível se os controlos negativos se apresentarem límpidos, confirmando que nestes não ocorreu qualquer proliferação microbiana, e os controlos positivos apresentarem turvação, indicador de crescimento microbiano.

Os valores de CMI foram visualizados a olhos nu, através da turvação do meio. Quando não é possível obter CMI visual, realiza-se uma análise à influência que as diferentes concentrações dos extratos têm na percentagem de crescimento bacteriano e fúngico. Para isso, os valores das absorvâncias lidas a 600 nm, foram normalizados como percentagem relativamente ao controlo positivo, considerando este o máximo crescimento dos microrganismos, seguindo os seguintes passos:

- 1.** Subtraiu-se os valores das absorvâncias obtidos no toh, antes da incubação das placas, aos valores das absorvâncias obtidos no t24h e t48h, após 24h e 48h de incubação, respetivamente;
- 2.** Uma vez que cada concentração em estudo foi testada em duplicado, procedeu-se ao cálculo da média dos valores das absorvâncias obtidas no ponto 1, de modo que a cada concentração correspondesse um único valor de absorvância;
- 3.** Os valores obtidos no ponto 2 foram normalizados, fazendo a multiplicação por 100 e dividindo pelo valor do controlo positivo correspondente;
- 4.** Os resultados são reportados como a média das percentagens de crescimento microbiano de pelo menos dois ensaios independentes e respetivo desvio-padrão (DP), que não deve exceder os 10%.

3.3. Atividade Antioxidante

O ensaio da determinação da capacidade antioxidante por redução do DPPH permite determinar o potencial antioxidante dos extratos em estudo, através da redução de radicais livres existentes no DPPH.

O DPPH é considerado um radical livre estável, com uma cor roxa forte, que produz uma banda de absorção em metanol aos 517 nm e que na presença de uma amostra capaz de doar um íon de hidrogénio, origina a sua forma reduzida. A capacidade da amostra em reduzir o DPPH traduz-se na perda gradual da cor roxa e pelo aparecimento da cor amarela, característica da forma reduzida do DPPH. A capacidade antioxidante do extrato em estudo é tanto maior quanto menor for a quantidade de DPPH não reduzido, sendo assim considerado um método indireto de avaliação da capacidade antioxidante.

Os resultados obtidos são normalizados relativamente a um composto cuja atividade antioxidante é conhecida, o que permite obter o EC₅₀ (concentração eficiente), isto é, a concentração de extrato que consegue reduzir 50% da concentração inicial de DPPH e posteriormente efetuar o cálculo do IAA (Índice de Atividade Antioxidante).

A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método de redução do DPPH, adaptando as metodologias anteriormente descritas por Kedare S. B. e Singh R.P. (2011), Molyneux P. (2004) e Scherer R. e Godoy H. T. (2009) [43]–[45].

3.3.1. Reagentes

As soluções necessárias para a execução do procedimento experimental foram preparadas em balões volumétricos de 50 mL. A primeira solução continha 2,5 mg de DPPH diluído em 50 mL de metanol e a segunda 2,5 mg de ácido ascórbico diluído em 50 mL de metanol.

Uma vez que ambas as soluções se degradam quando expostas à luz, os balões volumétricos foram envolvidos em papel de alumínio após a sua preparação. Posteriormente, as soluções foram guardadas a 4°C.

Aquando da realização dos ensaios, as soluções atingiram a temperatura ambiente antes da sua utilização.

3.3.2. Avaliação da Capacidade Antioxidante da Amostra

De modo a escolher a gama de trabalho que se adeque ao ensaio, é necessário avaliar a capacidade antioxidante dos extratos. Para isso, foram preparadas diluições sucessivas de cada extrato em tubos *ependorf*. Prepararam-se 5 tubos com 900 µL de metanol e adicionaram-se 100 µL de extrato no primeiro tubo, ocorrendo assim uma diluição 1:10. A amostra foi diluída sequencialmente até 1:100000. De seguida, foram preparados novos tubos *ependorf*, com 100 µL de cada diluição de amostra preparada anteriormente. Adicionaram-se 100 µL de DPPH a cada um dos tubos e envolveram-se em papel de alumínio para posterior incubação durante 30 min à temperatura ambiente.

Findo o período de incubação, verificou-se a alteração da cor roxa para a cor amarela, ou seja, a ocorrência da redução do DPPH pela amostra. A gama de trabalho selecionada corresponde às diluições a partir das quais se observa uma perda gradual da cor roxa.

No caso das amostras em estudo, tanto para o extrato IA como para o extrato HA, foi selecionada a gama de trabalho a iniciar-se numa diluição de 1:10 (250 µL de extrato + 2250 µL de metanol).

3.3.3. Determinação do EC50

Para cada ensaio independente de determinação de EC50, foram preparadas 3 placas não estéreis de 96 poços, uma para a análise do ácido ascórbico e duas para análise das amostras em estudo, sendo que uma se destinava ao extrato de IA e outra ao extrato HA.

- **Placa de Ácido Ascórbico**

A preparação das placas padrão iniciou-se com a adição de 100 µL de metanol 100% a todos os poços, exceto aos poços da coluna 1. De seguida, adicionaram-se 300 µL da solução preparada de DPPH aos poços A1, B1, C1 e realizaram-se diluições 1:1,5 sequenciais, com a transferência de 200 µL do poço anterior para o poço seguinte, ao longo da placa. Aos poços D1, E1, F1, G1, H1 foram adicionados 300 µL da solução preparada de Ácido Ascórbico e o mesmo procedimento de diluições foi repetido.

Feitas as diluições, e de modo a perfazer um volume final de 200 µL por poço, adicionaram-se 100 µL de metanol aos poços das linhas A a E e 100 µL de DPPH aos poços das linhas F a H. A placa foi envolvida em papel de alumínio e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, as absorvâncias de cada poço das placas foram lidas a 517 nm num leitor de microplacas.

- **Placa com a Amostra em Estudo**

A preparação das placas com a amostra em estudo, iniciou-se igualmente com a adição de 100 µL de metanol a todos os poços, exceto nos poços da coluna 1. De seguida, adicionaram-se 300 µL da amostra em estudo, na gama de trabalho definida anteriormente no ensaio de avaliação da capacidade antioxidante da amostra, aos poços A1, B1, C1, F1, G1, H1 e realizaram-se diluições 1:1,5 sequenciais, com a transferência de 200 µL do poço anterior para o poço seguinte, ao longo da placa.

Feitas as diluições, adicionaram-se 100 µL de DPPH aos poços das linhas A, B e C e 100 µL de metanol aos poços F, G e H. A placa foi envolvida em papel de alumínio e incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente.

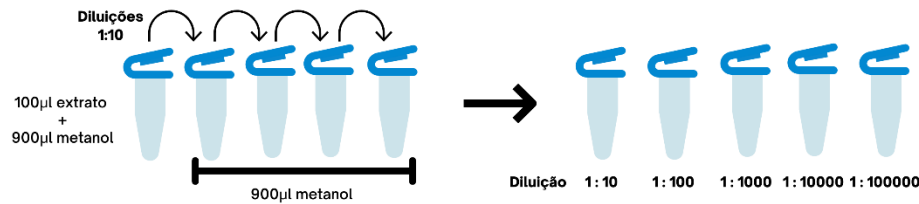
Após o período de incubação, confirmou-se visualmente a obtenção de um perfil sequencial de redução do DPPH (de amarelo para roxo) e as absorvâncias de cada poço das placas foram lidas a 517 nm num leitor de microplacas.

3.3.4. Esquema Representativo da Metodologia Aplicada

A seguinte Figura 3: A e B esquematiza a metodologia aplicada no ensaio da determinação da capacidade antioxidante dos extratos.

A

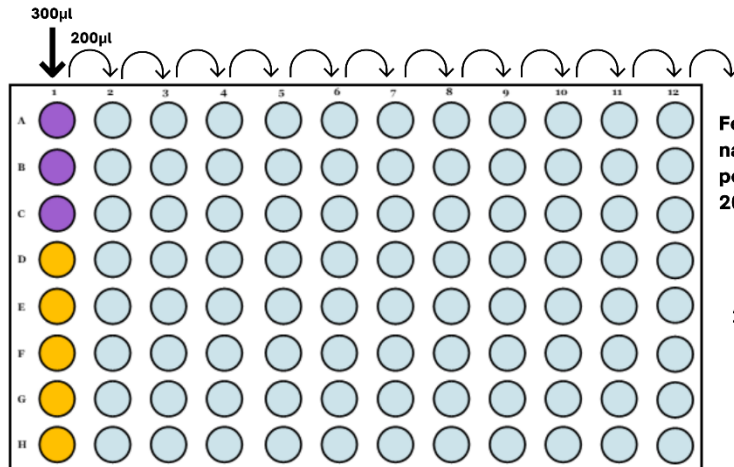
1 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA AMOSTRA



1. Pipetar 100µl de cada diluição para novos tubos *Eppendorf*;
2. Adicionar 100µl de DPPH e envolver os tubos em papel de alumínio;
3. Incubar 30min à temperatura ambiente.

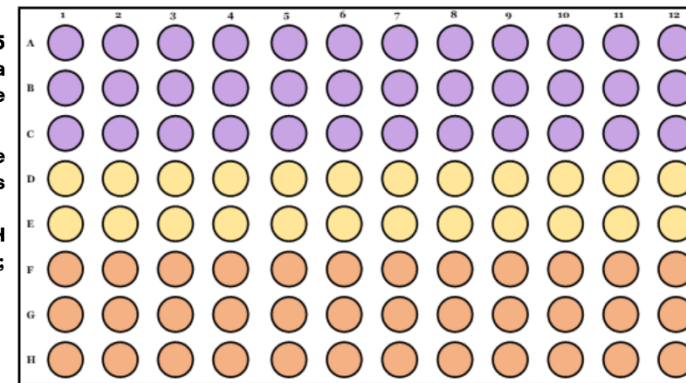


2 DETERMINAÇÃO EC50 - PLACA PADRÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO



Feitas as diluições de 1 : 1,5 na placa e de modo a perfazer um volume final de 200µl por poço:

1. Adicionar 100µl de metanol aos poços das linhas A - E;
2. Adicionar 100µl de DPPH aos poços das linhas F - H;



Legenda:



1. Envolver a placa em papel de alumínio e incubar 30 min à temperatura ambiente;
2. Ler as absorvâncias a 517nm.

B

3 DETERMINAÇÃO EC50 - PLACA COM A AMOSTRA EM ESTUDO

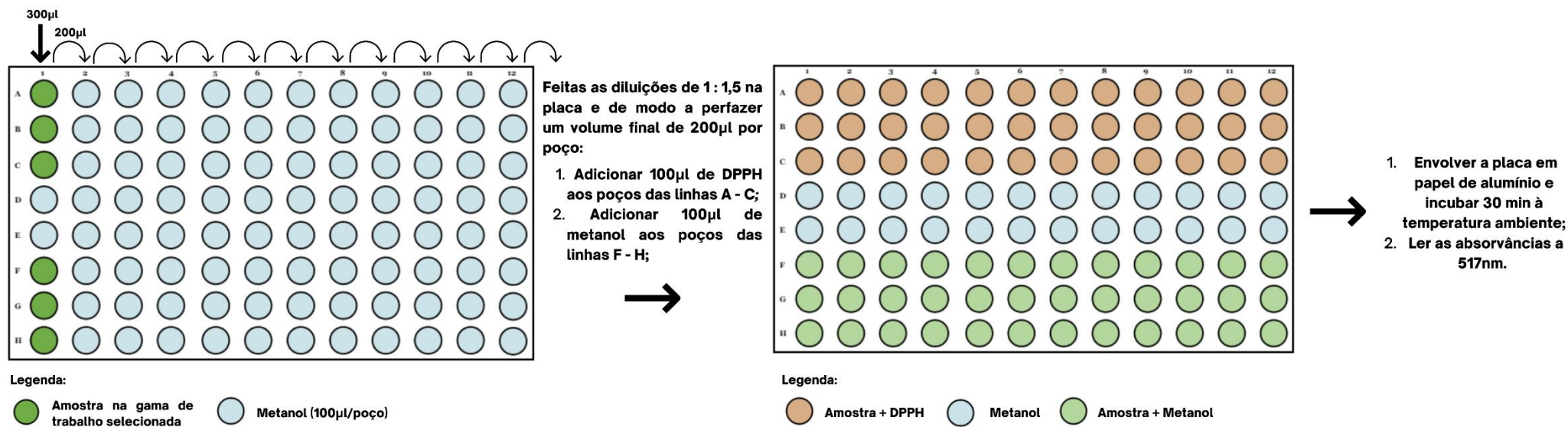


Figura 3 - Esquema elaborado no Canva® representativo da metodologia aplicada na execução do ensaio de redução do DPPH para avaliação da atividade antioxidante da *Echinacea purpurea* IA e HA.

3.3.5. Tratamento dos Resultados

Foram realizados e validados 3 ensaios independentes para cada extrato, que compreenderam a um triplicado de absorvâncias para as diferentes concentrações em teste. A validação incluiu a determinação do EC₅₀ de um padrão controle, isto é, um composto com atividade antioxidante conhecida que, no caso do presente trabalho, se tratou do ácido ascórbico.

O tratamento dos valores das absorvâncias lidas a 517 nm permitiram determinar o EC₅₀ e IAA para cada extrato em estudo, através dos seguintes passos:

1. Construção da Reta de Calibração do DPPH

A reta de calibração foi construída com as concentrações de DPPH em teste e com a média das absorvâncias obtidas para cada uma delas, calculando-se de seguida o declive da mesma. O coeficiente de correlação (R^2) da reta foi superior a 0,99 e foi construída com um mínimo de cinco valores.

2. Determinação do EC₅₀ do Ácido Ascórbico

À média das absorvâncias obtidas para as concentrações de ácido ascórbico com a adição do DPPH, subtraiu-se a média das absorvâncias das concentrações de ácido ascórbico sem adição de DPPH. Procedendo-se, de seguida, à seguinte ordem de passos:

- 2.1.** Calculou-se a concentração de DPPH que não foi reduzida em cada poço utilizando a equação da reta de calibração do DPPH, contruída no passo 1;
- 2.2.** Calculou-se a concentração de DPPH reduzida, subtraindo os valores obtidos no ponto 2.1 à concentração inicial de DPPH;
- 2.3.** Calculou-se a percentagem de redução do DPPH, multiplicando por 100 a concentração de DPPH reduzida, obtida no ponto 2.2, e dividindo pela concentração inicial de DPPH;
- 2.4.** Com os valores obtidos no ponto 2.3., construiu-se a respetiva reta de calibração da percentagem de redução do DPPH em relação às diferentes concentrações de ácido ascórbico. O coeficiente de correlação (R^2) desta reta foi superior a 0,99 e foi construída com um mínimo de 5 valores;
- 2.5.** Através das equações das retas, calculou-se os valores de EC₅₀ do ácido ascórbico para cada ensaio independente.

3. Determinação do EC₅₀ e IAA do Extrato em Estudo

O procedimento descrito no ponto 2 foi repetido para os extratos em estudo, substituindo apenas os valores das absorvâncias obtidos para o ácido ascórbico, pelos valores obtidos para cada extrato.

O cálculo do IAA fez-se através da divisão da concentração final de DPPH pelo valor obtido de EC₅₀.

Os valores de EC₅₀ e IAA determinados para a amostra não devem variar mais de 15% relativamente à média dos 3 ensaios independentes e devem calhar na mesma categoria da escala que classifica de fraca a forte a capacidade antioxidante da amostra.

3.4. Atividade Citotóxica

O ensaio de redução do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] visa avaliar o efeito dos extratos da planta na atividade metabólica das células quando comparadas com células não tratadas.

O MTT é um sal amarelo solúvel em água que, ao ser reduzido metabolicamente pelas células, dá origem a cristais roxos de formazano. Estes cristais não têm a capacidade de permeabilizar as membranas celulares e, deste modo, ficam acumulados no interior das células, permitindo a sua quantificação por espectrofotometria, após solubilização com álcool [46]. Desta forma, trata-se de um método indireto uma vez que o número de células metabolicamente viáveis está relacionado com a quantidade de formazano detetada.

Os resultados obtidos são normalizados como percentagem relativamente ao controlo, em que as células são expostas apenas ao meio de cultura, considerando-se a percentagem de redução de MTT representativa da viabilidade celular. Desta forma, quanto menor a percentagem de redução de MTT, menor a viabilidade celular e, por isso, maior o potencial citotóxico do extrato.

A atividade citotóxica dos extratos em fibroblastos da pele foi determinada *in vitro* adaptando a metodologia anteriormente descrita para o ensaio de MTT da ISO/EN 10993-5 – *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity* [47].

3.4.1. Tratamento das Células e Preparação da Placa de 96 Poços

As células incluídas no estudo tratam-se de fibroblastos de pele de ratinho, da linha celular 3T3 (NIH/3T3; ATCC CRL-1658), sendo representativas da derme. Aquando do começo do estudo, a linha celular em questão encontrava-se na passagem 16.

A cultura das células fez-se em meio DMEM suplementado com 3,7 g/L de bicarbonato de sódio, 25 mM de glucose, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal (FBS) inativado. O meio preparado foi posteriormente ajustado para um pH de 7,2 e esterilizado por filtração, usando uma membrana com 0,22 µm de porosidade. A cultura realizou-se em frascos de cultura de 75 cL e foi mantida em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Duas vezes por semana ou sempre que atingia 80% de confluência, sofria uma nova passagem.

O estudo iniciou-se num momento de confluência das células e de modo a preparar a suspensão celular a ser utilizada no ensaio, começou-se por retirar o meio do frasco de cultura e adicionou-se 3 mL de uma solução Tripsina (0,05%) /EDTA (0,02%), deixando atuar aproximadamente 5 minutos, com o objetivo de destacar as células do frasco. De seguida, foram adicionados 7 mL de meio, neutralizando, assim, a ação da tripsina. A mistura resultante, de células suspensas em meio e tripsina, foi posteriormente transferida para um tubo *falcon* de 15 mL e centrifugada a 250 RCF, durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células depositado no fundo do frasco, foi ressuspenso em 10 mL de meio. Da solução resultante, retirou-se 10 µL para um tubo *eppendorf* e adicionou-se 10 µL de Azul Triptano, que irá sinalizar as células viáveis existentes na contagem feita com recurso à câmara de *Neubauer*. A concentração de células viáveis por mL de solução é obtida através da seguinte equação:

[Células Viáveis] (células viáveis/mL) = Média de Células Viáveis por Quadrante × 2 (Fator de Diluição) × 10⁴ (Fator associado à Câmara de Neubauer)

Conhecendo a concentração de células viáveis por mL de solução, foi possível proceder à diluição da suspensão celular, utilizando meio de cultura, de modo que cada poço da placa de 96 poços contivesse 10^4 células em 100 μL de suspensão celular. Posteriormente, duas placas estéreis de 96 poços foram semeadas, uma para cada extrato em estudo, em que cada poço continha 100 μL da suspensão celular obtida e, de seguida, foram a incubar durante 24h, a 37°C com 5% de CO_2 . De maneira a proteger as células dos fatores externos, foi feita uma moldura de PBS nos poços das extremidades das placas.

3.4.2. Preparação dos Estímulos e Estimulação das Células

- **Placa Extrato Infusão Aquosa**

As concentrações do extrato IA foram preparadas em tubos *ependorf* estéreis. Num primeiro tubo *ependorf* foram colocados 750 μL de extrato e 750 μL de meio. Nos restantes tubos *ependorf* colocou-se apenas 750 μL de meio. A partir do primeiro foram realizadas sucessivas diluições 1:2, dando origem a uma gama de teste com 7 concentrações de 50 a 0,78 (%v/v).

Posteriormente, foi preparado o controlo de solvente que visa expor as células à maior concentração de solvente em estudo, com o objetivo de aferir a sua possível interferência na viabilidade das células. Assim, por se tratar de um extrato em meio aquoso, a solução de teste do solvente foi obtida através da junção de 750 μL de água para preparações injetáveis com 750 μL de meio.

O controlo positivo provoca uma resposta citotóxica reprodutível nas células, deixando-as inviabilizadas. Para este controlo foi preparada uma solução de SDS a 2%, contendo 150 μL de SDS (numa concentração inicial de 10%) e 600 μL de meio.

O controlo negativo tem o propósito de não provocar qualquer resposta citotóxica nas células, sendo constituído na sua totalidade por meio de cultura.

Os volumes foram otimizados de maneira a serem suficientes para que os poços correspondentes a cada concentração de extrato e controlos, contivessem 100 μL das soluções preparadas.

Após a preparação dos estímulos, o meio foi removido de cada poço da placa anteriormente semeada e descartado com cuidado para que as células permanecessem aderidas ao fundo. Nos poços correspondentes foram adicionados 100 μL dos respetivos estímulos e controlos preparados. A placa foi depois colocada a incubar durante 24 horas a 37°C com 5 % de CO_2 .

- **Placa Extrato Hidroalcoólico**

A metodologia aplicada para o extrato HA, na preparação dos estímulos e posterior estimulação das células, é a mesma que a descrita anteriormente para o extrato IA, com a diferença na gama de concentrações em teste, bem como no controlo de solvente. Assim, no tubo *ependorf* inicial foram colocados 75 μL de extrato e 1425 μL de meio, dando origem a uma gama de concentrações entre 5 e 0,08 (%v/v), após as sucessivas diluições de 1:2. O controlo de solvente foi obtido pela junção de 75 μL de etanol e 1425 μL de meio.

3.4.3. Ensaio de MTT

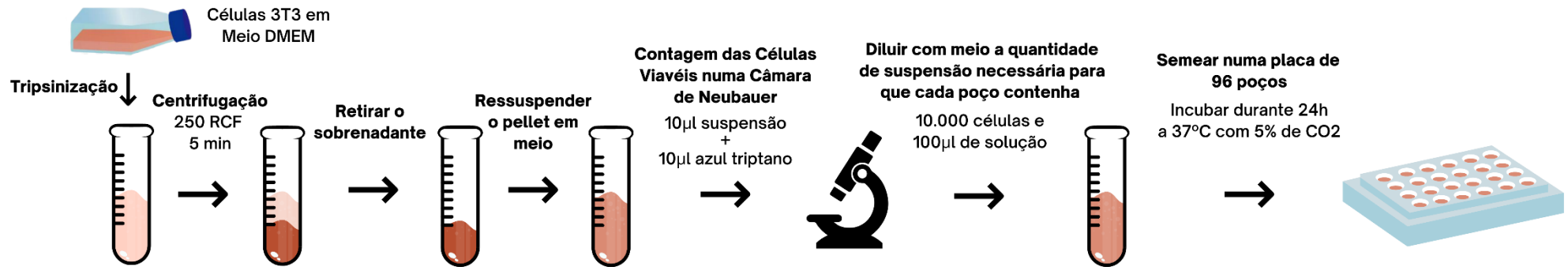
Após o período de incubação das células com os estímulos, os mesmos foram removidos e descartados com cuidado. De seguida, fez-se uma lavagem com 150 μL de PBS, para garantir que não ficaram resíduos dos estímulos, que pudessem interferir com a conversão do MTT. No escuro, colocou-se posteriormente 100 μL de MTT (1 mg/mL), previamente preparado em meio incompleto (sem FBS), a cada poço e colocaram-se as placas a incubar, revestidas em papel de alumínio, durante 4 horas a 37 °C com 5 % de CO₂.

Findo este período de incubação, o MTT foi removido com cuidado e foram adicionados 100 μL de isopropanol que foi ressuscitado, de modo a promover a dissolução dos cristais de formazano. Por último, procedeu-se à leitura das absorvâncias a 570 nm e 630 nm, no leitor de microplacas.

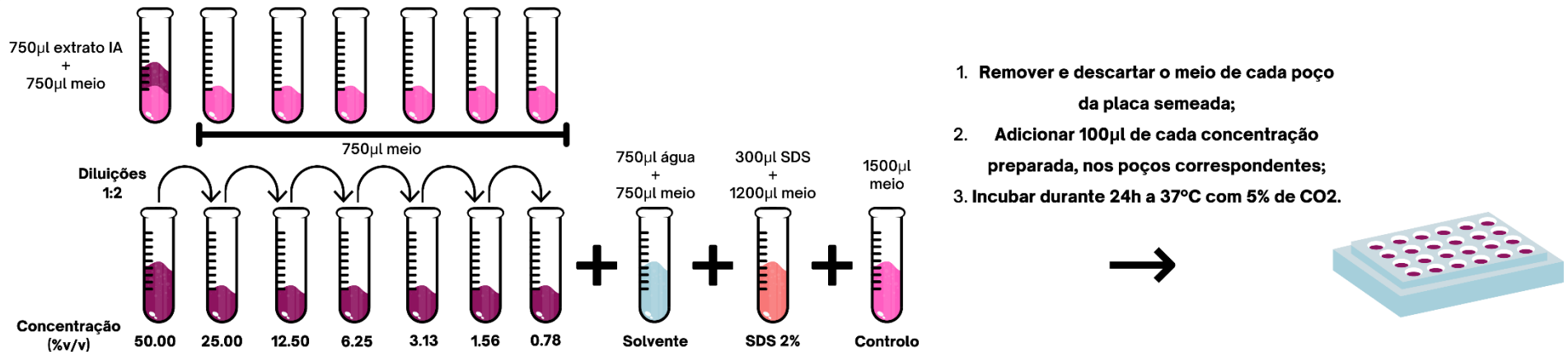
3.4.4. Esquema Representativo da Metodologia Aplicada

As seguintes Figuras 4 e 5 esquematizam a metodologia aplicada na determinação da atividade citotóxica dos extratos.

1 TRATAMENTO DAS CÉLULAS E PREPARAÇÃO DA PLACA DE 96 POÇOS



2 PREPARAÇÃO DOS ESTÍMULOS E ESTIMULAÇÃO DAS CÉLULAS



3 EXECUÇÃO DO ENSAIO DE MTT

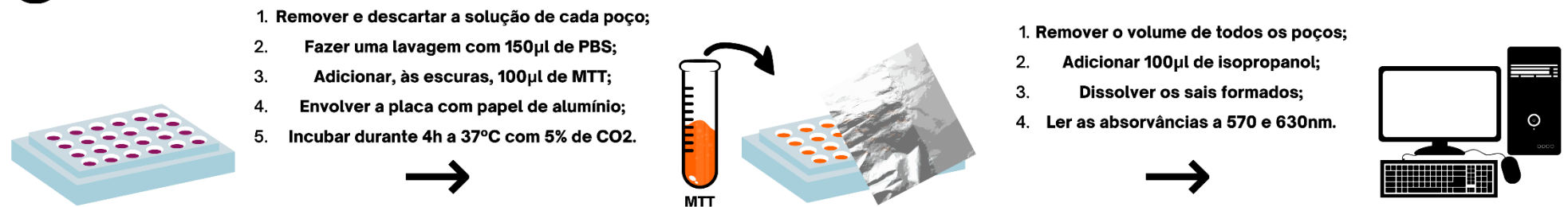
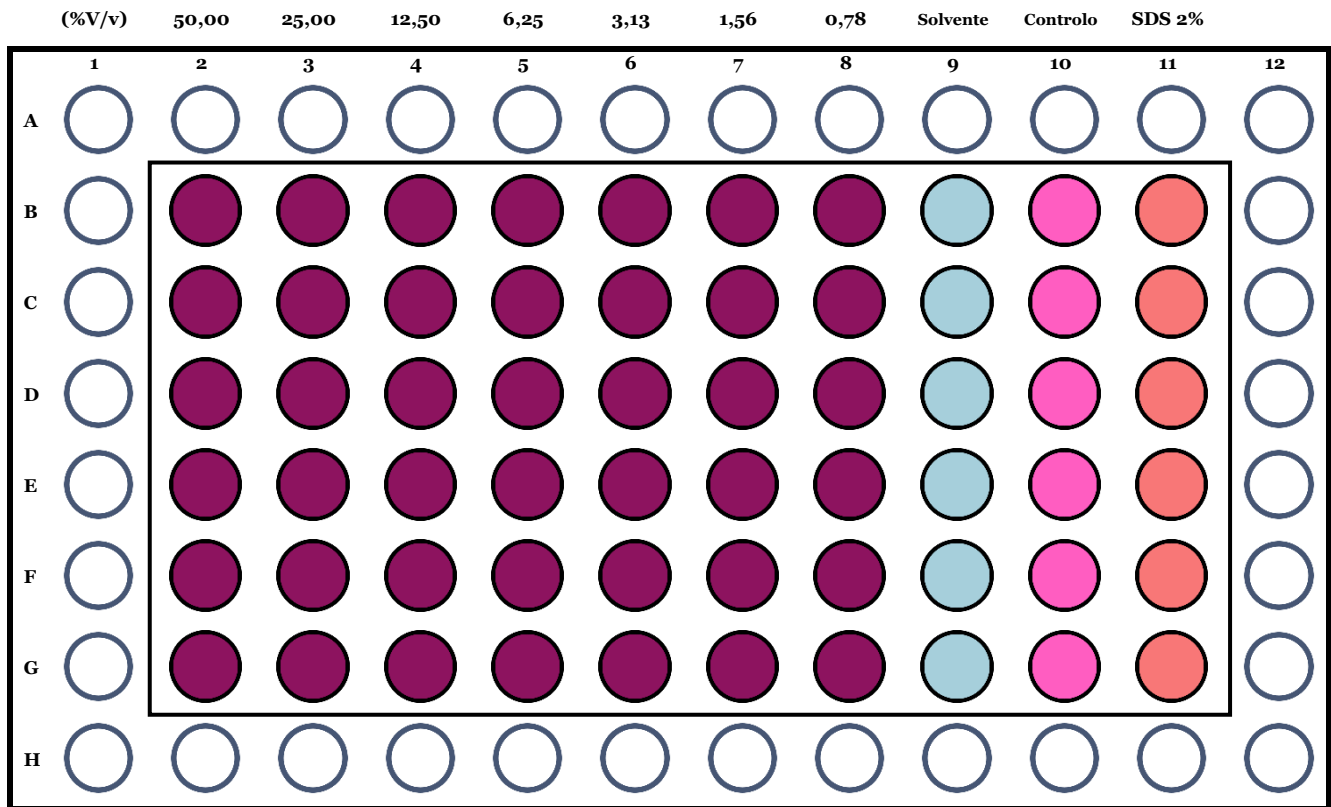


Figura 4 – Esquema elaborado no Canva® representativo da metodologia aplicada na execução do ensaio MTT para avaliação da atividade citotóxica da *Echinacea purpurea* IA. Adaptar a metodologia para o extrato HA.



Legenda:

- **Moldura de PBS**
- **Extrato** – Ensaios em estudo em que as células são expostas ao respetivo estímulo por ordem decrescente de concentração (%v/v) do extrato.
- **Solvente** – Controlo de solvente em que as células são expostas à maior concentração de solvente em estudo.
- **Controlo** – Controlo negativo em que as células são expostas apenas a meio de cultura DMEM.
- **SDS 2%** – Controlo positivo em que as células são expostas a uma solução de SDS a 2%.

Figura 5 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT para a *Echinacea purpurea* IA. Adaptar a metodologia para o extrato HA.

3.4.5. Tratamento dos Resultados

Por cada ensaio independente realizaram-se 6 repetições em placa, tanto para os controlos como para as concentrações de extrato em teste, sendo que, para cada extrato se realizaram 3 ensaios independentes. O tratamento e análise dos resultados obtidos consistiu nos seguintes passos:

- 1.** Os valores das absorvâncias lidos a 570 nm, para cada controlo e concentração teste, foram subtraídos aos respetivos valores de absorvância lidos a 630 nm;
- 2.** A normalização dos valores obtidos no ponto 1 fez-se através da sua multiplicação por 100 e divisão pelo valor calculado para o controlo negativo (células expostas apenas ao meio de cultura), em que a viabilidade celular é considerada máxima;
- 3.** Os resultados são reportados como a média dos valores obtidos no ponto 2 para os 3 ensaios independentes realizados e respetivo DP, que não deve exceder os 20%. Estes valores correspondem à percentagem de redução de MTT, que é representativa da viabilidade celular.

4. Apresentação e Discussão dos Resultados

4.1. Caracterização Fitoquímica

A identificação dos compostos foi feita a partir de curvas de calibração com padrões adquiridos e depois foram quantificados (Concentração Calculada) consoante a concentração de amostra injetada. A caracterização química resultante do método definido encontra-se descrita na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização fitoquímica da *Echinacea purpurea* IA e HA por HPLC.

Compostos Fenólicos	Concentração Calculada (µg/mL)	
	IA	HA
Ácido Gálico	3,073	5,160
Ácido Clorogénico	255,742	15,420
Ácido Cafeico	12,304	10,441
Rutina	16,018	32,874
Resveratrol	1,857	3,157

Os resultados obtidos dizem respeito à caracterização fitoquímica de ambos os extratos em estudo sendo que, neste caso, se focou na descrição da constituição em compostos fenólicos. Foram identificados três ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido clorogénico e ácido cafeico), um flavonoide (rutina) e um polifenol (resveratrol). Verificou-se que o composto maioritário do extrato IA é o Ácido Clorogénico e que o do extrato HA é, por sua vez, a Rutina.

O perfil fenólico da *E. purpurea* tem sido descrito como sendo pouco diversificado, observando-se uma variabilidade consistente. As suas flores em comparação com as raízes, são mais ricas em compostos fenólicos e o ácido chicórico apresenta-se como componente principal, a par do ácido caftárico. A abundância em compostos fenólicos tem sido relacionada tanto com a parte da planta (folhas, flores, caules ou raízes), como com a fase do ciclo de crescimento em que esta se encontra [15], [24]. A porção ocupada por estes compostos vai diminuindo nas partes aéreas e aumentando nas raízes, à medida que a planta matura [15]. Para além destes fatores, estas diferenças podem ser explicadas pela localização geográfica, bem como pelas condições de crescimento. Também os métodos de extração e quantificação utilizados influenciam nos resultados obtidos, assim como as condições de conservação [28].

Sloley *et al.* estudaram extratos etanólicos das raízes e folhas da *E. purpurea* e encontraram como composto predominante o ácido chicórico. Nos extratos das folhas, foi detetada rutina [48]. Da mesma maneira, Chiou Shiow-Ying *et al.* determinaram para um extrato etanólico de flores de *E. purpurea* que dentro dos compostos fenólicos constituintes, o ácido chicórico ocupava a maior percentagem, seguido do ácido caftárico, ácido clorogénico e ácido cafeico [49].

Mohamed Sharif *et al.* determinaram que o teor em compostos fenólicos é mais elevado em extratos aquosos das folhas de *E. purpurea*, seguido dos extratos aquosos e metanólicos das flores. Os ácidos fenólicos representam mais de 90% do total de compostos fenólicos identificados, sendo o composto mais abundante o ácido chicórico, com a maior concentração deste a ser apresentada nas folhas. A rutina foi também detetada em maior quantidade no extrato metanólico das folhas de *E. purpurea* [28].

Tendo em conta que o ácido chicórico e o ácido caftárico são os ácidos fenólicos mais referidos na literatura como os principais compostos fenólicos da *E. purpurea*, estes resultados não vão de encontro aos resultados obtidos na análise por HPLC efetuada para os extratos em estudo.

O facto de estes terem sido preparados a partir de uma mix sólida, que corresponde a várias partes aéreas de *E. purpurea* (troços de caule, folhas e inflorescências), não permite obter uma relação direta com o tipo de extrato e a sua composição. No entanto, é possível concluir que seguem o mesmo perfil de composição maioritária em ácidos fenólicos, apesar de não serem os mesmos referidos na literatura.

Posto isto, a utilização de outro tipo de métodos de quantificação seria interessante para tentar perceber o teor total em compostos fenólicos de cada extrato, bem como para identificar outro tipo de componentes, que não compostos fenólicos, e com igual potencial interessante, relacionando-os posteriormente com a bioatividade dos extratos.

4.2. Atividade Antimicrobiana

Uma vez que tanto para o extrato IA como para o HA, não se observou nitidamente a ausência de turvação do meio dos poços com as concentrações em teste para a maioria das estirpes incluídas no estudo, não foi possível determinar diretamente os valores de CMI.

À exceção da *C. albicans* que por observação direta da placa de 96 poços foi possível detetar a redução do crescimento dos microrganismos, pela ausência de turvação do meio, estando os valores obtidos para a gama de concentrações testadas de *E. purpurea* IA e HA, descritos na Tabela 3. No entanto, no caso do extrato IA, a CMI detetada corresponde à concentração mais baixa da gama testada, o que não permite afirmar que esta seja efetivamente a menor concentração à qual ocorre a inibição do crescimento visível do microrganismo em questão. Neste sentido, seria profícuo testar este extrato em particular numa gama mais baixa de concentrações e, assim, perceber o verdadeiro potencial antimicrobiano que apresenta contra a *C. albicans*.

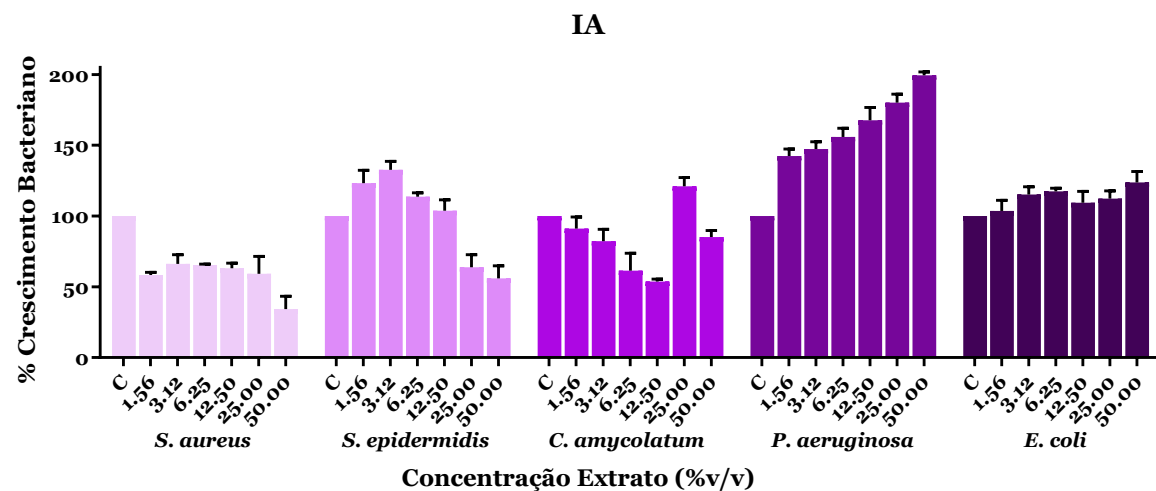
Tabela 3 – Concentração Mínima Inibitória Visual (%v/v) da *C. albicans* para a gama de concentrações testadas de *E. purpurea* IA e HA.

	CMI Visual (%v/v)	
	IA	HA
<i>C. albicans</i>	<1,56	0,31

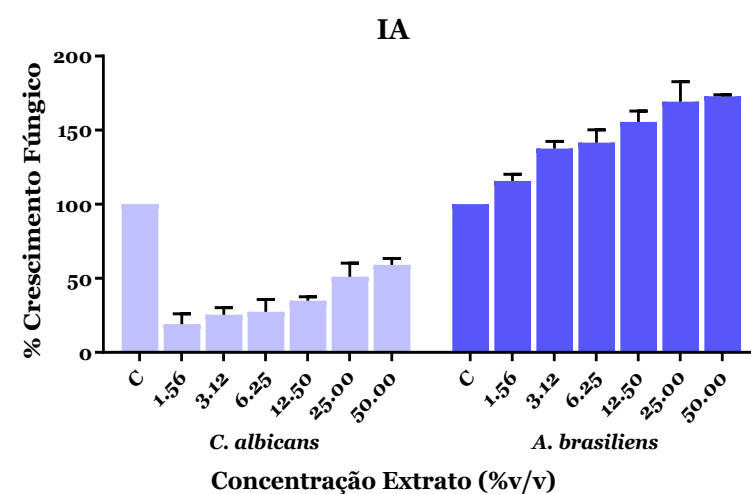
Para os restantes microrganismos, não foi possível visualizar diretamente a atividade antimicrobiana de ambos os extratos, já que nenhuma das suas concentrações foi responsável por reduções visíveis dos seus crescimentos. Desta forma, foi feita uma análise à influência das diferentes concentrações destes na percentagem do crescimento dos microrganismos estudados.

A Figura 6 representa graficamente a atividade antimicrobiana da *Echinacea purpurea* extrato IA (A.1 e A.2) e do extrato HA (B.1 e B.2), sendo que, quanto maior a atividade antimicrobiana apresentada por um extrato, menor a percentagem de crescimento bacteriano e fúngico.

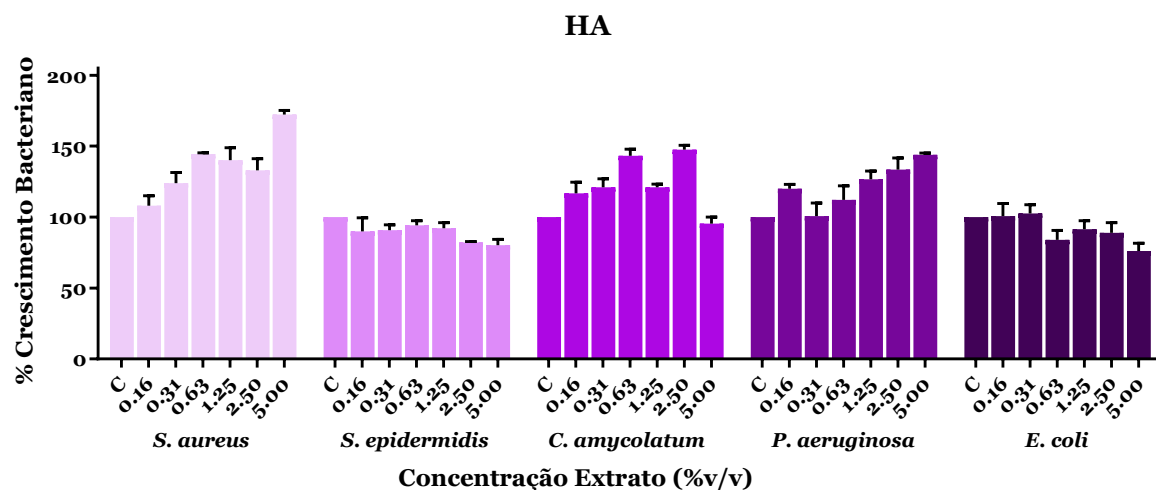
A.1



A.2



B.1



B.2

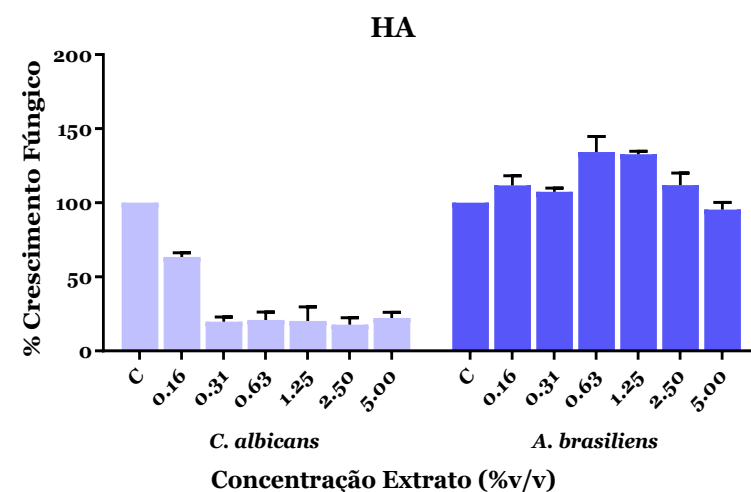


Figura 6 – Representação gráfica da percentagem de crescimento bacteriano e fúngico, após exposição, de respetivamente 24h ou 48h, a diferentes concentrações (%v/v) de *Echinacea Purpurea* IA e HA. Os resultados foram normalizados ao controlo positivo (crescimento microbiano a 100% na ausência de extrato) e são apresentados como a média ± DP de pelo menos 2 ensaios independentes.

Analisando os resultados obtidos é possível concluir que os valores de CMI observados visualmente para a *C. albicans* coincidem com as percentagens de crescimento obtidas deste microrganismo, tanto para o extrato IA como para o extrato HA. O facto de a concentração mínima necessária para inibir esta estirpe ser menor para o extrato IA, pressupõe que este possua maior capacidade antimicrobiana relativamente ao extrato HA. No entanto, este último é capaz de inibir o crescimento da *C. albicans* em mais de 80% para a maioria das concentrações em teste.

No que concerne aos efeitos provocados pelos extratos em estudo nas restantes estirpes, no caso do extrato IA existe alguma inibição do crescimento das bactérias gram positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. amycolatum*), exercendo um maior efeito sobre o *S. aureus*. Por outro lado, o extrato HA não afeta o crescimento da maioria das estirpes em estudo, à exceção da *C. albicans* referida anteriormente. No geral, ambos os extratos possuem uma atividade antimicrobiana relativamente baixa.

Além disso, observou-se que, para certas estirpes, os extratos têm um efeito positivo no seu crescimento. Este efeito poderá estar relacionado com componentes dos extratos não identificados na análise por HPLC, que servem de substrato e que promovem o crescimento dos microrganismos. No caso das estirpes que fazem parte da microbiota da pele (*S. epidermidis* e *C. amycolatum*), poderá ser benéfico uma vez que existe potencial de compatibilidade com os microrganismos comensais cutâneos, preservando a microbiota natural da pele. O extrato IA, apesar de para concentrações mais elevadas inibir o crescimento do *S. epidermidis*, para as restantes concentrações testadas, apresenta o efeito positivo referido, assim como para o *C. amycolatum* na concentração de 25 %v/v. Já o extrato HA, apenas afeta positivamente o crescimento do *C. amycolatum* para concentrações inferiores a 25 %v/v. No entanto, este efeito positivo torna-se uma desvantagem no que toca às restantes estirpes visto que a proliferação das mesmas está associada a potenciais infeções. Desta forma, é importante dar especial atenção ao efeito positivo que os extratos IA e HA apresentam no crescimento da *P. aeruginosa* e do *A. brasiliensis*, assim como do *S. aureus*, no caso do extrato HA.

Stanislavljević *et al.* mostraram que um extrato hidroetanólico das partes aéreas de *E. purpurea* tem atividade contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, com a sensibilidade relativamente ao *S. aureus*, *C. albicans* e *S. cerevisiae* a ser superior quando comparada com a dos antibióticos usados para controlo. No entanto, para o *Aspergillus niger* não se observou inibição do seu crescimento. A atividade antimicrobiana reportada foi associada ao teor total em compostos fenólicos e flavonoides da *E. purpurea* [26].

Coelho *et al.* reportaram que extratos de *E. purpurea*, apesar de não apresentarem atividade microbicida relativamente às estirpes estudadas, inibem o crescimento destas, à exceção da infusão aquosa que não apresentou qualquer atividade, mesmo em concentrações mais elevadas. Os extratos que demonstraram maior poder antimicrobiano foram os orgânicos extraídos com diclorometano, acetato de etilo e acetona, afetando o crescimento da generalidade dos microrganismos em estudo (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* e *C. albicans*) [36].

Mohamed Sharif *et al.* testaram a atividade antimicrobiana de vários extratos (extraídos com água, metanol e acetato de etilo) da folhas e flores de *E. purpurea* contra 21 estirpes representativas de patologias humanas, incluindo microrganismos gram positivos, gram

negativos, cocos, bacilos, aeróbicos e anaeróbios facultativos. Os extratos aquosos, em comparação com os restantes extratos estudados, foram os que apresentaram menor potencial antimicrobiano [28].

Tendo em conta a literatura, seria de esperar uma maior atividade antimicrobiana por parte destes extratos, bem como que o extrato HA mostrasse um potencial antimicrobiano superior ao extrato IA, porém, no presente estudo ocorreu o oposto, com o extrato IA a conseguir inibir o crescimento de um maior número de estirpes. Este comportamento pode estar relacionado tanto com o facto de o extrato aquoso ter sido testado numa gama de concentrações dez vezes superior ao extrato hidroetanólico, como com o seu teor elevado em ácidos fenólicos, uma vez que a hipótese de que este tipo de compostos são os responsáveis pela atividade antimicrobiana da *E. purpurea*, já foi apresentada e comprovada anteriormente [26], [28]. Da mesma maneira, o facto de os métodos de preparação e extração dos extratos, bem como as suas composições, diferirem daqueles que foram os extratos já estudados, poderá explicar esta discrepância nos resultados.

Dado que o comportamento antimicrobiano dos extratos, segundo a literatura, está relacionado com o seu teor em ácidos fenólicos, não será de esperar que sejam estes os responsáveis pelo efeito positivo também observado e que se refletiu num aumento da percentagem de crescimento de algumas das estirpes testadas. Neste sentido, existe a possibilidade de outro tipo de compostos químicos ser responsável por este comportamento e que não foram identificados pelo método analítico utilizado neste estudo. Futuramente, poderá ser interessante a aplicação de outros métodos que permitam identificar uma maior diversidade de compostos, bem como estudar, isoladamente, os mesmos, para avaliar qual a sua contribuição na atividade demonstrada pelos extratos.

4.3. Atividade Antioxidante

A capacidade antioxidante do extrato é tanto maior quanto menor for a concentração necessária para que ocorra uma redução de 50% da concentração inicial de DPPH, ou seja, quanto menor for o seu valor de EC₅₀.

A figura 7 representa graficamente as retas de calibração da solução de DPPH obtidas para cada ensaio independente que permitiram obter os perfis antioxidantes do ácido ascórbico (Figura 8) e dos extratos IA e HA em estudo (Figuras 9 e 10, respetivamente), bem como calcular os respetivos valores de EC₅₀ (Tabelas 4 e 5).

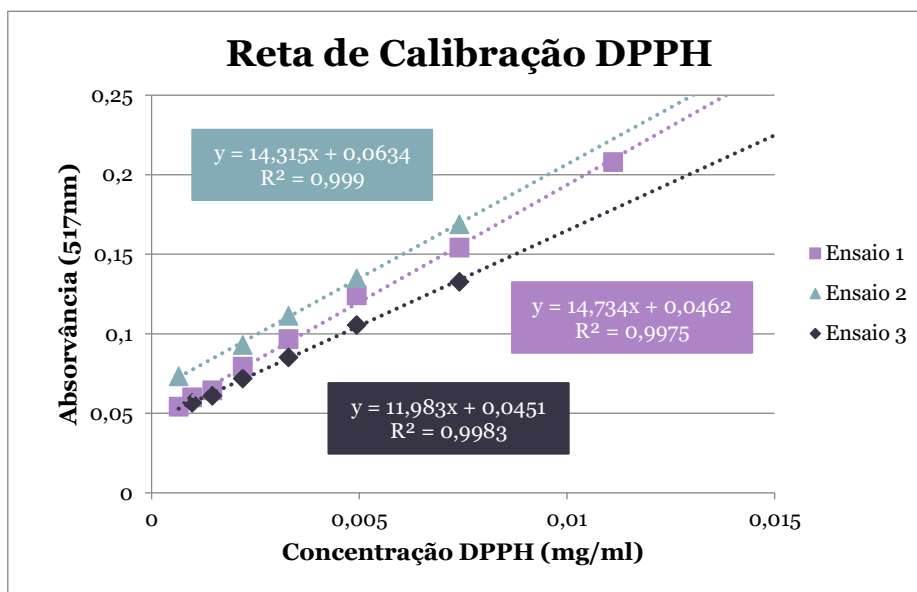


Figura 7 - Representação gráfica da reta de calibração DPPH. Absorvâncias a 517 nm para os 3 ensaios independentes realizados, na presença de diferentes concentrações de DPPH (mg/ml), com as respetivas linhas de tendências. Ensaio 1: $y = 14,734x + 0,0462$ com $R^2 = 0,9975$; Ensaio 2: $y = 14,315x + 0,0634$ com $R^2 = 0,999$; Ensaio 3: $y = 11,983x + 0,0451$ com $R^2 = 0,9983$.

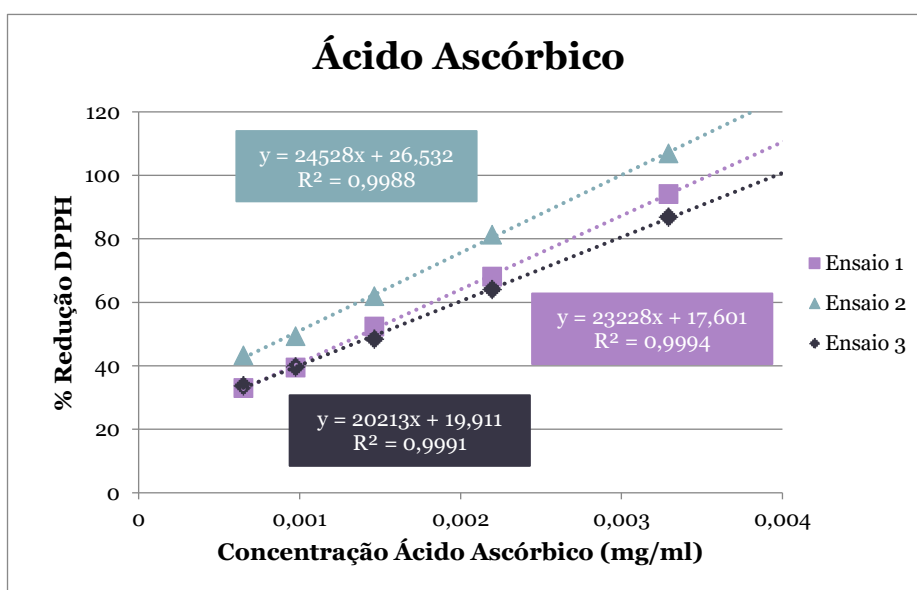


Figura 8 – Representação gráfica do perfil antioxidante do Ácido Ascórbico. Percentagens de redução do DPPH (%), para os 3 ensaios independentes realizados, na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico (mg/ml), com as respetivas linhas de tendências. Ensaio 1: $y = 23228x + 17,601$ com $R^2 = 0,9994$; Ensaio 2: $y = 24528x + 26,532$ com $R^2 = 0,9988$; Ensaio 3: $y = 20213x + 19,911$ com $R^2 = 0,9991$.

Tabela 4 - Valores obtidos de EC₅₀ (µg/ml) para o padrão controle de Ácido Ascórbico.

EC ₅₀ Ácido Ascórbico (µg/ml)				
Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Média	Desvio Padrão
1,39	0,96	1,49	1,28	0,28

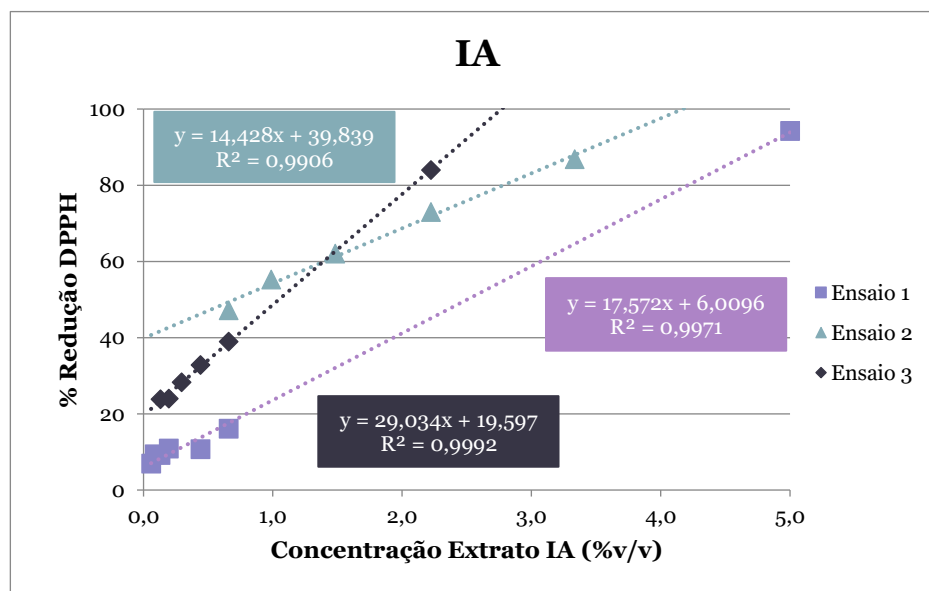


Figura 9 - Representação gráfica do perfil antioxidante do Extrato IA. Percentagens de redução do DPPH (%), para os 3 ensaios independentes realizados, na presença de diferentes concentrações de IA (% v/v), com as respectivas linhas de tendências. Ensaio 1: $y = 17,572x + 6,0096$ com $R^2 = 0,9971$; Ensaio 2: $y = 14,428x + 39,839$ com $R^2 = 0,9906$; Ensaio 3: $y = 29,034x + 19,597$ com $R^2 = 0,9992$.

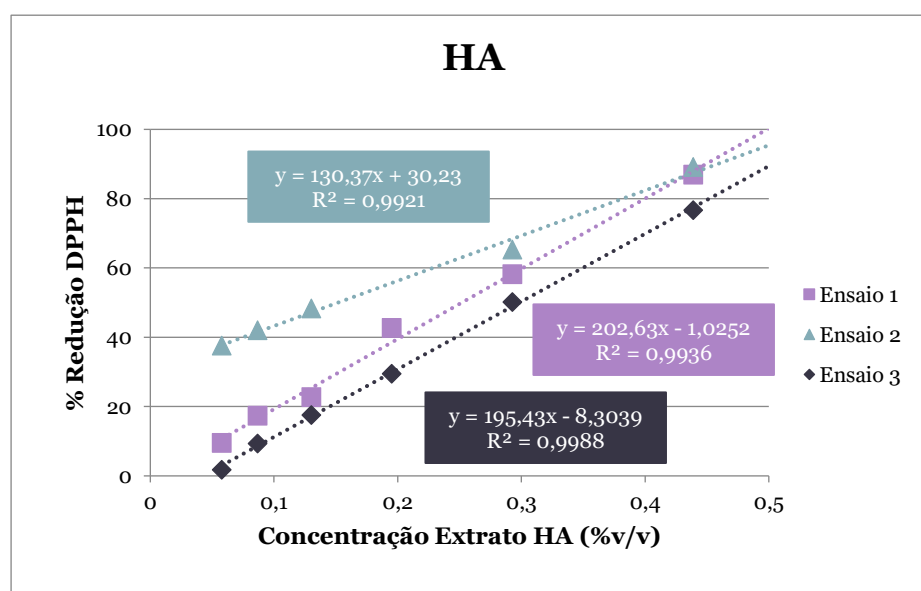


Figura 10 - Representação gráfica do perfil antioxidante do Extrato HA. Percentagens de redução do DPPH (%), para os 3 ensaios independentes realizados, na presença de diferentes concentrações de HA (% v/v), com as respectivas linhas de tendências. Ensaio 1: $y = 202,63x - 1,0252$ com $R^2 = 0,9936$; Ensaio 2: $y = 130,37x + 30,23$ com $R^2 = 0,9921$; Ensaio 3: $y = 195,43x - 8,3039$ com $R^2 = 0,9988$.

Tabela 5 - Valores obtidos de EC₅₀ (%) e IAA para a *Echinacea purpurea* IA e HA.

	IA		HA	
	EC ₅₀ (%)	IAA	EC ₅₀ (%)	IAA
Ensaio 1	2,50	0,05	0,25	0,50
Ensaio 2	0,70	0,18	0,15	0,82
Ensaio 3	1,05	0,12	0,30	0,42
Média	1,42	0,12	0,23	0,58
Desvio Padrão	0,96	0,06	0,07	0,22
Observação	Capacidade Antioxidante Fraca		Capacidade Antioxidante Moderada	

No que toca ao IAA, para valores inferiores a 0,5 a capacidade antioxidante é considerada fraca; para valores entre 0,5 e 1,0 moderada; entre 1,0 e 2,0 forte e para valores superiores a 2,0 muito forte. Tendo isto em conta, os resultados obtidos sugerem que o extrato IA tenha uma capacidade antioxidante considerada fraca, enquanto o extrato HA apresenta uma capacidade antioxidante moderada.

Ainda que não seja possível obter uma relação direta entre o padrão controlo de ácido ascórbico e os perfis antioxidantes dos extratos em estudo, dada a diferença nas grandezas de medida da concentração, é possível observar que há certas semelhanças no perfil antioxidante apresentado pelo ácido ascórbico e pelo extrato HA, o que sugere que este tipo de extrato apresenta na sua constituição agentes antioxidantes.

A atividade antioxidante da *E. purpurea* já foi demonstrada [26], [28], [48], [50]–[52]. De maneira geral, os extratos testados apresentaram uma capacidade antioxidante média a baixa em comparação com as outras plantas medicinais e aromáticas investigadas [51]. A atividade antioxidante pode ser atribuída aos compostos polifenólicos, tais como os flavonoides e ácidos fenólicos [52]. Entre estes compostos, os derivados do ácido cafeico são conhecidos pela sua forte atividade antioxidante, que se deve principalmente à presença de um segundo grupo OH e de uma fração fenilpropanóide [24].

No caso do extrato IA, apesar do seu teor extremamente elevado em ácidos fenólicos, em particular de ácido clorogénico, não há por parte deste extrato uma atividade antioxidante significativa, sendo esta considerada fraca. Estes resultados não vão de encontro ao estudado por Jukic *et al.*, em que o ácido clorogénico apresentou ter uma capacidade antioxidante superior a compostos antioxidantes de referência [50]. Do mesmo modo, não corrobora os resultados apresentados por Sharif *et al.*, que obtiveram maior capacidade antioxidante para extratos aquosos das folhas e flores de *E. purpurea*, sendo esta proporcional à quantidade de polifenóis [28]. No entanto, o facto de tanto a composição do extrato, como a sua preparação, não coincidirem com a efetuada no presente estudo, assim

como a falta de uniformização do método analítico utilizado nos diversos estudos, pode justificar esta divergência nos resultados obtidos.

O extrato HA, apresenta igualmente na sua composição ácidos fenólicos, como o ácido clorogénico e o ácido cafeíco, e ainda flavonoides, como a rutina, compostos já conhecidos pela sua atividade antioxidante [50], [53], podendo isso justificar a capacidade antioxidante moderada apresentada pelo extrato, sugerindo ainda que ocorre um efeito sinérgico entre o potencial antioxidante destes compostos. Esta capacidade já tinha sido demonstrada tanto por Stanisavljević *et al.* como por Jukic *et al.*, para extratos etanólicos semelhantes ao estudado [26], [50]. Outro exemplo é o estudo de Georgieva *et al.* em que o extrato etanólico testado apresentou inclusivamente um maior poder antioxidante comparativamente com o ácido ascórbico, tendo sido proporcional ao teor fenólico do extrato [51].

4.4. Atividade Citotóxica

Quanto menor a percentagem de redução do MTT, menor a viabilidade celular e, consequentemente, maior a ação tóxica do extrato. Concentrações que prejudicam a viabilidade celular em mais de 30%, quando comparado com o controlo, ou seja, quando a percentagem de redução de MTT é inferior a 70%, são consideradas citotóxicas.

A Figura 11 representa graficamente a atividade citotóxica da *Echinacea purpurea* extrato IA (A) e do extrato HA (B) para a linha celular de fibroblastos 3T3 em estudo.

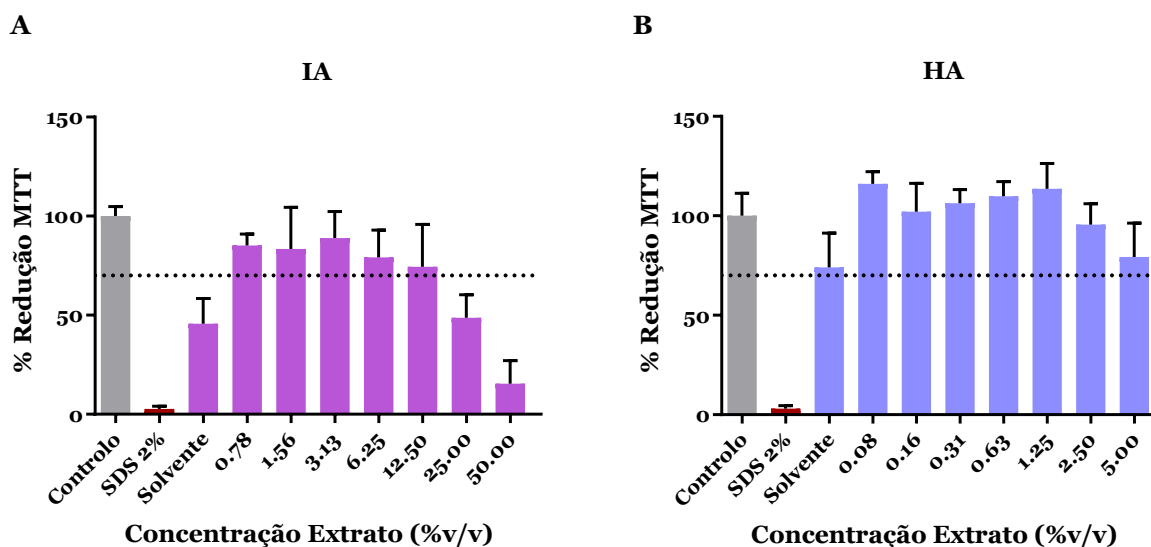


Figura 11 - Representação gráfica da percentagem de redução do MTT, representativa da viabilidade celular de células 3T3, após uma exposição de 24h a diferentes concentrações (%v/v) de *Echinacea purpurea* IA e HA. Os resultados foram normalizados ao controlo negativo (células não estimuladas com extrato) e são apresentados como a média \pm DP dos 3 ensaios independentes realizados.

Relativamente ao extrato IA, apresenta um perfil potencialmente citotóxico para a linha celular em estudo, uma vez que para concentrações mais elevadas (25,00 – 50,00 %v/v) ocorre uma diminuição da viabilidade celular superior a 30%, relativamente ao controlo. Para a concentração mais alta testada de IA (50 %v/v), existe uma redução da viabilidade celular da linha celular 3T3, quando comparada com o controlo negativo, com a percentagem de redução de MTT a atingir apenas os 15 %, fazendo desta a concentração mais tóxica de todas as que integraram o estudo. No geral, é possível verificar que o efeito citotóxico deste extrato é dependente da dose, com percentagens de viabilidade celular mais baixas para concentrações mais elevadas de extrato IA.

A citotoxicidade detetada para o extrato IA pode estar relacionada, em parte, com o solvente, que neste caso é a água, uma vez que nos resultados obtidos para o controlo de solvente, este demonstrou afetar a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3, com a percentagem de redução de MTT a atingir valores abaixo dos 50%. Este fator e o facto de a atividade citotóxica ter sido detetada em concentrações mais elevadas do extrato, em que a percentagem de água é igualmente maior, poderá contribuir para estes resultados. O mecanismo causador desta citotoxicidade pode estar relacionado com processos osmóticos em que a difusão da água através das membranas celulares afeta a viabilidade das células. Contudo, como para a maior concentração de extrato testada (50%), a citotoxicidade foi

superior à obtida para o controlo de solvente usado para simular a diluição obtida por esta concentração, este não parece ser o único fator responsável pela citotoxicidade verificada.

Outros fatores estarão relacionados, por exemplo, com a composição química do extrato. Os compostos fenólicos são conhecidos pela sua atividade antioxidante que é baseada em reações de oxidação-redução. Estas reações são reversíveis e dependentes da concentração o que faz com que os compostos fenólicos possam atuar tanto como antioxidantes como pro-oxidantes, dependendo das condições a que a reação acontece [54]. Isso explica o facto de que a determinadas concentrações em compostos fenólicos, haja uma redução na viabilidade das células. Pinho *et al.* estudaram este comportamento em particular para os ácidos gálico e caféico, que demonstram ser citotóxicos para fibroblastos 3T3 quando em concentrações mais elevadas [54]. Uma vez que estes ácidos foram identificados no extrato IA e que este foi testado numa gama de concentrações elevada, poderá igualmente justificar a citotoxicidade apresentada.

Por outro lado, o extrato HA tem um potencial biocompatível na generalidade das concentrações estudadas, uma vez que, não se constatou qualquer percentagem de redução de MTT inferior a 70%, o que indica que este extrato não apresenta potencial citotóxico para a linha celular 3T3, nas concentrações em estudo. Pelo contrário, para as concentrações mais baixas (0,08 – 1,25 %v/v) ocorre um aumento das percentagens de redução de MTT para valores acima de 100 % do controlo negativo, confirmando assim a biocompatibilidade deste extrato com a linha celular em estudo.

A investigação feita até ao momento relativamente a extratos HA focaram-se apenas na sua atividade citotóxica sobre algumas células cancerígenas, tendo sido provado que este afeta a viabilidade deste tipo de células, dependendo da concentração do extrato a que as células são expostas [28], [34]–[36]. O facto de no presente estudo este não demonstrar o mesmo efeito citotóxico em linhas celulares saudáveis de fibroblastos 3T3, tendo até um efeito possivelmente estimulador sobre as mesmas, poderá demonstrar que os compostos que o constituem influenciam de maneira diferente a viabilidade celular, estando este processo dependente tanto do tipo de linhas celulares utilizados, como da gama de concentrações testada. É exemplo disso, o ácido gálico que produz uma resposta citotóxica dose-dependente, uma vez que para doses elevadas afeta a viabilidade celular mas em doses baixas, promove a proliferação dos fibroblastos [54].

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A crescente valorização dos produtos cosméticos na sociedade atual, assim como a necessidade de uma preservação eficaz e segura dos mesmos, tem obrigado a indústria da cosmética a procurar alternativas aos ingredientes conservantes normalmente utilizados nestes produtos. Tendo isto em conta, o presente estudo procurou avaliar a bioatividade de dois extratos naturais da planta *Echinacea purpurea* (infusão aquosa e hidroalcoólico), incluindo o seu potencial conservante, bem como a sua segurança biológica e o seu possível contributo na área do antienvhecimento, enquanto ingredientes ativos.

O facto de os extratos terem sido estudados em gamas de concentrações distintas, não permite fazer uma correlação direta entre as suas atividades. No entanto, é possível verificar que o extrato IA na gama de concentrações testada apresentou uma atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e contra a *C. albicans*, atividade antioxidante baixa e potencial citotóxico para concentrações mais elevadas. Por outro lado, o extrato HA não demonstrou potencial antimicrobiano relevante, à exceção da sua atividade contra a *C. albicans*, já a sua capacidade antioxidante demonstrou-se moderada e, através da determinação da citotoxicidade, apresentou ser seguro biologicamente, mantendo a viabilidade celular dos fibroblastos 3T3.

Desta forma, o extrato HA parece ser aquele com maior potencial para uma aplicação efetiva como ingrediente conservante adjuvante em formulações cosméticas e como ingrediente ativo na área do antienvhecimento.

Futuramente, seria interessante continuar este estudo de maneira a perceber se é possível preencher os requisitos de aplicabilidade e segurança de ingredientes naturais do SCCS. Neste sentido, poderá ser importante perceber o contributo dos compostos maioritários dos extratos na bioatividade demonstrada por estes, bem como testar outras gamas de concentrações, de modo a otimizar o seu potencial como ingredientes cosméticos.

De igual modo, analisar outro tipo de atividades biológicas poderia ser profícuo, conferindo aos extratos um potencial alargamento da sua gama de aplicação na área da indústria cosmética. Dentro destas, a atividade anti-inflamatória, sendo que muitas afeções cutâneas envolvem um estado inflamatório; ensaios de migração celular, para perceber a sua contribuição nos processos de cicatrização da pele; ensaios que comprovem uma ação protetora do DNA; e ainda aprofundar o conhecimento daquilo que é o perfil de segurança dos extratos, determinando os seus potenciais efeitos mutagénicos e realizando testes de irritação e sensibilização cutânea.

Capítulo 2 – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

1. Introdução

A Farmácia Comunitária (FC) é uma das principais e mais importantes portas de entrada no Sistema de Saúde, não só por ser determinante na promoção da literacia em saúde, mas também por permitir a acessibilidade ao medicamento e a equidade na prestação de cuidados de saúde de qualidade a todos os cidadãos, independentemente da sua localização geográfica [55], [56].

É um espaço que se caracteriza pela prestação de cuidados de saúde de elevada diferenciação técnico-científica dos farmacêuticos que nele exercem e que tem como objetivo servir a comunidade sempre com a maior qualidade, realizando tanto atividades dirigidas para o medicamento, como atividades dirigidas para o utente [55], [56].

O presente relatório pretende descrever a experiência e aprendizagem que me foram transmitidas ao longo do estágio de carácter curricular, que decorreu na Farmácia Social Mutualista Covilhanense (FSMC) no período de 8 de fevereiro a 18 de junho de 2021, sob orientação da diretora técnica Dra. Rita Oliveira. Os objetivos inerentes ao estágio incluem a consolidação e desenvolvimento dos conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), bem como mostrar a realidade da profissão farmacêutica no dia-a-dia de uma FC que serve uma população maioritariamente envelhecida.

2. Caracterização e Organização da Farmácia Social Mutualista Covilhanense

2.1. Contextualização, Localização e Horário de Funcionamento

A FSMC encontra-se integrada nas instalações da Associação de Socorros Mútuos Mutualista Covilhanense (ASMMC), onde existe um centro clínico, um gabinete de enfermagem e uma estrutura residencial para idosos, com as modalidades de centro de dia e de apoio domiciliário.

A FSMC está localizada na Rua Capitão João de Almeida, na Covilhã, encontrando-se aberta ao público desde janeiro de 2013, de segunda a sexta das 9h às 19h e sábado das 9h à 13h, sem interrupção para almoço.

Sendo uma farmácia do setor social e de acordo com o artigo n.º 59-A do Decreto-Lei n.º 307/2007 de 31 de agosto, apenas é permitida a dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM) aos membros associados [57]. Desde 1 de setembro de 2016 que funciona também como Local de Venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (LVMNSRM) e, por isso, está desde então aberta à população em geral para a venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e produtos de saúde. No entanto, apenas os associados usufruem de até 10% de desconto em MSRM, consoante o PVP

rotulado, e de 10% de desconto nos restantes produtos, excluindo os integrados no protocolo da diabetes.

2.2. Espaço Físico

2.2.1. Espaço Exterior

O exterior da farmácia cumpre, não só com os requisitos definidos nas Boas Práticas Farmacêuticas (BPF) para a FC, como com o disposto no artigo 28º do Decreto-Lei n.º 307/2007 de 31 de agosto, devidamente alterado pelo Decreto-Lei n.º 171/2012 de 1 de agosto [55], [57].

Posto isto, na fachada do edifício da ASMMC é possível encontrar o símbolo “cruz verde” e as escalas de serviço das farmácias do município, devidamente iluminadas. Na entrada da farmácia, já no interior do edifício, encontram-se o vocábulo “farmácia”, assim como informações relativas ao nome da diretora técnica, horário de funcionamento, a existência de livro de reclamações e que o local é alvo de vigilância através de câmaras. Ainda na entrada da farmácia e de acordo com as direções da Direção Geral da Saúde (DGS) para a situação atual da pandemia COVID-19, encontram-se indicações como o uso obrigatório de máscara e do número máximo de pessoas permitidas no interior da farmácia [58].

O acesso exterior ao edifício da ASMMC, apesar de se encontrar numa rua inclinada na zona mais antiga da cidade, está devidamente adaptado de modo a garantir a acessibilidade a todos os seus potenciais utentes.

2.2.2. Espaço Interior

No que diz respeito ao espaço interior, este segue os parâmetros definidos nas BPF para a FC, apresentando um aspeto limpo e cuidado, com as superfícies de trabalho, armários e prateleiras lisos, laváveis e em material adequado, o que promove um espaço profissional e uma comunicação eficaz com os utentes. A iluminação, temperatura e ventilação são ajustadas às condições exigidas para garantir a segurança e conservação dos medicamentos e produtos de saúde existentes na farmácia [55].

A farmácia dispõe de uma zona de atendimento, um armazém, um laboratório e um gabinete de atendimento personalizado, tal como exige a lei. As instalações sanitárias igualmente exigidas, apesar de não se encontrarem no espaço físico da farmácia, localizam-se no corredor comum ao centro clínico da ASMMC, podendo ser utilizadas por todos os utentes. Existe ainda um gabinete da direção técnica, que em termos de legislação, é considerado uma divisão facultativa [57].

A zona de atendimento ao público é onde se realiza a dispensa dos medicamentos e produtos de saúde e se prestam os esclarecimentos acerca dos mesmos, estando dividida numa zona de exposição de produtos e numa zona de balcão. É nesta zona que se encontra a indicação dos descontos que a farmácia concede aos seus sócios no preço dos medicamentos e produtos.

Na zona de exposição, existe uma grande variedade de produtos, organizados por categorias como alimentação especial, dermocosmética, dentária, higiene, ortopedia, puericultura e suplementos alimentares, que são alvo de rotatividade frequente, quer seja por questões de promoção ou sazonalidade. Nesta zona encontra-se ainda um contentor VALORMED,

destinado à recolha de medicamentos fora de uso, entregues pelo utente e depositados pelo farmacêutico, para posterior reciclagem. De acordo com as orientações da DGS, encontra-se também nesta zona, à disposição dos utentes, um dispensador automático de solução antisséptica de base alcoólica que deve ser utilizado aquando da entrada no espaço. Além disso, uma das áreas de maior expressão na zona de exposição é a de equipamento de proteção individual, com uma grande variedade de máscaras de proteção bem como, de desinfetantes.

Na zona de balcão, existem dois balcões de atendimento devidamente separados de modo a permitir a privacidade dos utentes, cada um com computador e leitor de código de barras. Existe ainda uma impressora de receitas/talões e um terminal de multibanco, à disposição de ambos os balcões. Devido à situação pandémica, cada balcão encontra-se delimitado com um acrílico e existem marcações no chão para garantir a distância apropriada entre utentes e do balcão de atendimento.

Anteriormente à zona de balcão, encontram-se expostos MNSRM, MNSRM-EF, medicamentos de uso veterinário (MUV) e alguns produtos de saúde que, ao contrário dos produtos de saúde anteriormente mencionados, não se encontram acessíveis ao utente com o objetivo de promover o aconselhamento farmacêutico e o fornecimento de informação tendo em conta as necessidades individuais de cada utente. Estes encontram-se em prateleiras, organizados em função da indicação terapêutica como: desconforto digestivo; diarreia; obstipação; congestão nasal; dor e febre; tosse; pernas cansadas; dores musculares; cicatrização e desinfeção de feridas; alergias; picadas; entre outros. Na zona inferior às prateleiras, encontram-se móveis com gavetas devidamente identificadas com etiquetas, designada zona do cockpit, onde é possível encontrar tanto MSRM como MNSRM, incluindo produtos do protocolo da diabetes; produtos semissólidos; inaladores; produtos oftálmicos e otológicos; produtos ginecológicos; material de enfermagem como seringas, agulhas, ligaduras, adesivos, entre outros; e ainda alguns anti-inflamatórios e antipiréticos como ácido acetilsalicílico, paracetamol ou ibuprofeno.

A zona de armazém encontra-se dividida numa área de receção de encomendas, um móvel de gavetas deslizantes e duas áreas de armazenamento, sendo uma delas primária e outra secundária.

A área de receção de encomendas dispõe de um computador, um dispositivo de leitura ótica, uma impressora A4, outra de etiquetas e ainda uma de talões.

O móvel de gavetas deslizantes comporta MSRM e MNSRM arrumados por ordem alfabética de substância ativa, ordem crescente de dosagem e formas farmacêuticas, tais como comprimidos, cápsulas, xaropes, pós/granulados, soluções orais, soluções cutâneas e soluções injetáveis. As gavetas encontram-se etiquetadas ou com as iniciais da substância ativa que se encontra em cada uma delas e pela forma farmacêutica. Neste mesmo móvel existem ainda gavetas destinadas a armazenar produtos previamente reservados pelo utente, que são organizados consoante o estado em que o processo da dispensa dos mesmos se encontra, isto é, se já estão faturados e pagos; se estão faturados, mas não pagos ou ainda se não estão nem faturados nem pagos. Os medicamentos sujeitos a receita médica especial, como os psicotrópicos e estupefacientes, encontram-se armazenados numa gaveta fechada e separada dos restantes.

A área de armazenamento primário contém estantes organizadas à semelhança do que foi descrito para o móvel de gavetas deslizantes e que são destinadas ao stock excedente. Por sua vez, a área de armazenamento secundário, para além de conter stock para reposição das

prateleiras de exposição e cockpit na zona de atendimento, contém um armário destinado a encomendas de maior volume prontas a levantar pelo utente, bem como um frigorífico para armazenamento de produtos termolábeis que são conservados entre 2 e 8°C.

Todos os produtos são armazenados de acordo com o princípio “*first expire, first out*”, isto é, os que têm prazo de validade mais curto estão dispostos de forma que sejam os primeiros a ser dispensados.

A zona do laboratório apresenta-se como um espaço bem iluminado contendo um lavatório, uma bancada limpa e armários onde é possível armazenar matérias-primas e material necessário à preparação de manipulados ou à preparação de medicação individual, encontrando-se de acordo com o exigido nas BPF para a FC [55]. É nesta zona que se encontram também estantes destinadas a armazenar encomendas prontas para entrega ao domicílio.

A farmácia dispõe ainda de um gabinete de atendimento personalizado que está de acordo com as normas legais e disponível para prestar um aconselhamento mais personalizado, permitindo o diálogo confidencial a que o utente tem direito.

Por fim, no gabinete de direção técnica é onde se realiza toda a gestão administrativa e financeira da farmácia, nomeadamente a conferência de receituário e respetiva faturação. Dispõe de um armário onde se arquiva toda a documentação relativa aos medicamentos estupefacientes e psicotrópicos, registo de temperatura e humidade, entre outros.

A manutenção da limpeza do espaço da farmácia é feita por uma equipa de técnicos auxiliares de limpeza da ASMMC que cumpre todas as normas relativamente a este aspeto, inclusive as mais recentes orientações da DGS, com a intensificação das rotinas de higienização [55], [58]. Para além disso, toda a equipa da farmácia tem o cuidado de, regularmente, desinfetar a zona de atendimento bem como de fazer a higienização das mãos.

2.3. Recursos Humanos

Tendo em conta o Decreto-Lei n.º 307/2007 de 31 de agosto, uma farmácia pode ser constituída pelo quadro farmacêutico e pelo quadro não farmacêutico. Segundo o disposto no artigo 23º, devidamente alterado pelo artigo 2º do Decreto-Lei n.º 171/2012 de 1 de agosto, as farmácias devem possuir pelo menos um diretor técnico e um farmacêutico e os farmacêuticos devem constituir a maioria dos trabalhadores da farmácia [57].

A equipa da FSMC cumpre com o disposto anteriormente, sendo constituída na sua totalidade por um quadro farmacêutico jovem e dinâmico, incluindo a Drª. Rita Oliveira, diretora técnica, o Dr. João Matias, farmacêutico substituto, a Drª. Ana Farias, farmacêutica responsável pelo LVMNSRM, a Drª. Carolina Gonçalves e a Drª. Letícia Esteves, farmacêuticas.

No que diz respeito às funções da diretora técnica, é da sua competência garantir que há um correto aprovisionamento e conservação dos medicamentos, assegurar a transmissão de toda a informação que concerne ao medicamento, promovendo simultaneamente o seu uso racional, durante a dispensa, e que, no caso de se tratar de MSRM, certificar-se de que este só são dispensados sem a apresentação da receita, em casos devidamente justificados [57]. É também função da diretora técnica assegurar o cumprimento das regras deontológicas, dos princípios e deveres previstos na legislação, bem como responsabilizar-se por todos os

atos farmacêuticos praticados na farmácia e, não menos importante, preocupar-se com as condições de limpeza e segurança da farmácia, bem como com a higiene do pessoal [57]. Para além de cumprir os deveres dispostos por lei, a diretora técnica na FSMC efetua ainda a conferência do receituário e respetiva faturação, controla os prazos de validade e as condições de temperatura e humidade, organiza o espaço da farmácia e delega tarefas.

O farmacêutico substituto partilha algumas das responsabilidades com a diretora técnica, principalmente no que diz respeito à gestão da farmácia, dos seus stocks e da escolha dos seus fornecedores, de modo a otimizar o funcionamento da farmácia, que posteriormente se reflete na qualidade do atendimento prestado.

O clima entre a equipa da farmácia é de interajuda e cooperação, com a preocupação de investir numa formação continuada que permita a melhoria contínua do serviço prestado à comunidade.

2.4. Equipamentos e Sistema Informático

A FSMC tem à disposição dos seus profissionais de saúde todo o equipamento necessário à sua atividade, entre os quais: termohigrómetros, que monitorizam a temperatura e humidade; frigorífico para o armazenamento de medicamentos termolábeis; um terminal de pagamento por multibanco; leitores e impressoras de códigos de barras e um sistema de videovigilância com alarme, que assegura a segurança dos utentes, dos profissionais de saúde e dos medicamentos.

No que diz respeito ao sistema informático, a FSMC utiliza o 4 Digital Care®, um software bastante intuitivo, o que contribui diretamente para a otimização do desempenho do utilizador. A divisão do programa por oito secções, permite simultaneamente gerir as fichas dos utentes; gerar e aceder às encomendas feitas aos fornecedores; consultar informação acerca dos produtos existentes na farmácia, inclusive a sua localização no espaço da farmácia, stocks e informação científica atualizada, com opção de consulta direta do Resumo das Características do Medicamento (RCM); controlar os fluxos de stock, os prazos de validade e ainda gerir a faturação e o receituário. O acesso ao programa está dependente da introdução do nome de utilizador e palavra-passe permitindo, assim, que as tarefas e movimentos efetuados por cada profissional de saúde, fiquem registados.

Aquando da minha chegada à FSMC, o sistema informático, no que concerne às fichas dos medicamentos e produtos existentes, encontrava-se isento de sistematização, assim, uma das minhas tarefas durante o estágio foi exatamente a organização das fichas. Nesse sentido, primeiramente foi necessário categorizar os produtos em Acessório, Alimentação, Cosmético, Dentária, Dispositivo Médico, MNSRM, MNSRM-EF, MSRM, MSRM Especial ou Suplemento Alimentar, de acordo com a classificação e aplicação de cada um. De seguida, criou-se um sistema de classificação da localização dos produtos nas diversas zonas existentes da farmácia, referidas no ponto 2.2.2, nomeadamente, móvel, cockpit, prateleiras, frigorífico, armazém primário e armazém secundário. Dentro destas zonas, a organização depende da forma farmacêutica, grupo terapêutico ou problema a que se destina. Em forma de exemplo, o creme Bepanthen® Eczema é classificado como um dispositivo médico e a sua localização é as prateleiras, especificamente as destinadas aos cuidados da pele.

O facto de as fichas dos produtos conterem este tipo de informação e de haver um sistema de classificação e de localização definido, possibilita a uniformização dos procedimentos da

farmácia, permitindo um maior dinamismo da equipa da FSMC pois simplifica tanto o processo de arrumação dos produtos, como agiliza a localização dos mesmos aquando do atendimento.

3. Informação e Documentação Científica

Em qualquer farmácia, é fundamental a existência de fontes de informação científica, atualizadas e fidedignas, que estejam disponíveis para aceder durante todo o seu horário de funcionamento, de forma a garantir a qualidade do ato farmacêutico.

Posto isto, e de acordo com as BPF para a FC, a FSMC possui, em formato digital, as versões mais recentes da Farmacopeia Portuguesa e do Prontuário Terapêutico [55]. A consulta do RCM pode ser feita através do sistema informático, como referido no ponto anterior, ou diretamente na base de dados de medicamentos de uso humano (INFOMED) do INFARMED, uma vez que o acesso à internet está garantido em todos os computadores.

A FSMC recebe ainda no seu endereço eletrónico Circulares Informativas e Boletins de Farmacovigilância, sendo que estes são as fontes mais atualizadas de informação. Os laboratórios e armazéns usam esta mesma via para fazer a divulgação de campanhas e informação relativa a novos produtos, bem como para promover a realização de palestras e workshops.

Com a situação da pandemia, tornou-se imperativo que as farmácias se mantivessem constantemente a par das medidas impostas e de todas as orientações dadas pela DGS para o controlo da mesma. Na FSMC houve sempre esse cuidado de acompanhar a situação, com a consulta regular das mais recentes recomendações tanto do INFARMED e da DGS, como da Associação de Farmácias de Portugal (AFP), da qual a FSMC é associada.

4. Aprovisionamento e Armazenamento

4.1. Aquisição e Encomendas

Numa farmácia é preciso garantir que se presta um serviço de qualidade aos utentes, mas ao mesmo tempo, é importante cuidar da sustentabilidade financeira da mesma. Por este motivo, a escolha dos fornecedores com condições mais vantajosas, tanto a nível da qualidade do fornecimento dos produtos, como a nível financeiro, é fundamental para uma gestão adequada da farmácia. A decisão tem em conta fatores como a disponibilidade do produto a encomendar, o tempo de entrega, as campanhas em vigor, as condições de pagamento, a política de devoluções e ainda a qualidade da relação que o fornecedor mantém com a farmácia.

Deste modo, a FSMC trabalha maioritariamente com três fornecedores, sendo eles, a *Alliance Healthcare*, a *Empifarma* e a *Cooprofar*. No entanto, esporadicamente, são feitas encomendas a outros fornecedores, como *Plural*, ou diretamente aos laboratórios, principalmente, para produtos de venda sazonal, produtos ortopédicos, produtos de dermocosmética, entre outros. Este contacto é feito por intermédio de delegados de informação médica, uma vez que, a grandes volumes de produtos a encomendar, estão normalmente associadas certas vantagens financeiras.

O sistema informático permite a realização de 3 tipos diferentes de encomendas: diárias, instantâneas e através do Projeto Via Verde do Medicamento.

As encomendas diárias têm por base fatores como stocks mínimos e máximos, previamente definido; vendas até ao dia desse mês; vendas do período homólogo do ano anterior e ainda descontos aplicados. Este método permite não só evitar a rutura de stock, como rentabilizar os potenciais lucros, com a minimização do stock parado na farmácia. Deste modo na FSMC, duas vezes ao dia, é gerada uma sugestão de encomenda no programa informático, que é analisada, tendo em conta os critérios referidos anteriormente, e validada pela diretora técnica ou outro farmacêutico.

Quanto às encomendas instantâneas, são um complemento das anteriores, no sentido que têm como objetivo satisfazer reservas de produtos solicitados pelos utentes que, no momento do atendimento, não se encontram em stock na farmácia. Estas podem ser feitas através do sistema informático ou diretamente ao fornecedor, através de contacto telefónico, de maneira a confirmar a disponibilidade em armazém dos produtos solicitados, bem como, para garantir a sua chegada à farmácia com a maior brevidade possível.

Por último, as encomendas podem ser feitas através do Projeto Via Verde do Medicamento, que tem como objetivo melhorar o acesso a medicamentos cuja exportação/distribuição está comprometida devido ao stock insuficiente destes medicamentos, em função da sua procura. Deste modo, apresenta-se como uma via excecional de aquisição de um grupo de medicamentos, listados em anexo na Circular Informativa 019/CD/100.20.200 do INFARMED [59]. Quando a farmácia não tem em stock algum destes medicamentos, coloca a encomenda ao distribuidor aderente, com base numa receita médica válida para os medicamentos em causa, e o distribuidor satisfaz o pedido em função do stock que tem reservado para este canal.

No decorrer do estágio, tive oportunidade de perceber a importância que o processo de encomenda tem na qualidade do atendimento e da gestão de uma farmácia, realizando, por diversas vezes, as encomendas diárias e instantâneas, quando os atendimentos assim o requeriam, recorrendo inclusive à Via Verde do Medicamento.

4.2. Receção de Encomendas e Armazenamento

Na FSMC, durante a semana, no caso da *Alliance Healthcare*, existem diariamente dois momentos de entrega de encomendas, sendo que um é de manhã e outro de tarde. No caso dos restantes fornecedores, a entrega acontece apenas uma vez por dia, normalmente na parte da manhã. Aos sábados, recebe apenas uma encomenda de manhã por parte da *Alliance Healthcare*.

As encomendas vêm acondicionadas em contentores de plástico e são acompanhadas da respetiva fatura em duplicado, sendo que o original vai para a contabilidade e o duplicado é arquivado na farmácia. O processo de receção da encomenda é auxiliado pelo sistema informático, no separador “gestão de encomendas”, onde é possível selecionar a encomenda em receção e dar entrada dos produtos, recorrendo à leitura dos códigos de barras dos mesmos. No caso das encomendas efetuadas via telefone, por serem externas ao sistema, não aparecem no menu de encomendas e, por isso, é necessário fazer uma “receção direta” das mesmas. Aquando da receção das encomendas, é importante verificar o estado das embalagens e a validade dos produtos, dando prioridade aos que necessitam de ser armazenados no frio. A finalização do processo passa por conferir se os preços de venda à

farmácia indicados na fatura impressa coincidem com o apresentado no ecrã de receção da encomenda em questão, bem como, se o número de unidades corresponde ao encomendado.

De seguida, procede-se à etiquetagem dos produtos não éticos com o respetivo Preço de Venda ao Público (PVP), calculado a partir de um fator de ponderação que tem em conta o Preço de Venda à Farmácia (PVF), o IVA (6% ou 23%) e a margem da farmácia.

Os produtos que tenham sido encomendados com o objetivo de satisfazer reservas, são sinalizados pelo sistema e posteriormente identificados com um talão que contém a informação do utente que fez o pedido.

Após a receção da encomenda, os produtos entram diretamente para stock no sistema, e são arrumados de acordo com o tipo de medicamento e produto em questão, nas zonas descritas anteriormente.

4.3. Devoluções e Reclamações

Uma devolução de um medicamento ou produto de saúde pode ser motivada por razões diversas, tais como: embalagens danificadas ou abertas; prazo de validade curto ou ilegível; erros no pedido; remarcação de PVP; cumprimento de circular informativa emitida pelo INFARMED ou pelo laboratório. Os prazos dentro dos quais é aceitável solicitar uma devolução dependem do motivo e do fornecedor, visto que a política de devoluções varia de fornecedor para fornecedor.

No entanto, apesar do motivo subjacente, quando se devolve um produto é necessário criar-se uma nota de devolução, com recurso ao sistema informático no separador “gestão de devoluções”, onde está pré-definido como fornecedor, o último ao qual se adquiriu o produto em causa. Após a seleção do motivo da devolução e verificação dos dados, é gerada a nota de devolução, que é impressa em triplicado, assinada e carimbada. Os produtos a devolver devem ir devidamente acondicionados e acompanhados da nota de devolução correspondente. Por último, cabe ao fornecedor decidir se a devolução é ou não aceite. No caso de ser aceite, pode ser emitida uma nota de crédito ou é enviado um produto de substituição. No caso de ser recusada, o produto volta à farmácia e é colocado para quebra.

Durante o estágio, para além de ter realizado por diversas vezes devoluções de produtos motivadas pelas razões supramencionadas, efetuei também algumas reclamações. Estas foram relacionadas com produtos faturados, mas não enviados, e com a faturação a um PVP diferente do inscrito no produto. Nestas situações, o procedimento passou por contactar via telefone o serviço de apoio ao cliente do fornecedor em causa, em que me foi solicitado a identificação da farmácia, o número da fatura, o código do produto em questão e as respetivas quantidades. Posteriormente, no caso dos produtos em falta, deram a possibilidade de solicitar uma nota de crédito ou o envio dos mesmos. Por fim, forneciam o número de registo da reclamação, que era apontado no duplicado da fatura correspondente e arquivado na farmácia.

4.4. Controlo dos Prazos de Validade

Controlar os prazos de validade dos produtos existentes na farmácia, é essencial para assegurar a qualidade, eficácia e segurança dos mesmos. Para além disso, é fundamental para uma gestão de qualidade dos stocks, o que tem implicação direta na saúde financeira da farmácia. Nesse sentido, todos os meses, é feito um levantamento dos produtos cujo prazo de validade expira nos três meses seguintes. Para tal, recorre-se ao sistema informático, que lista estes produtos e, de seguida, confronta-se esta com o stock físico, retirando-se os que se confirmam estar próximos do fim do prazo de validade. Posteriormente, procede-se à devolução dos mesmos para os respetivos fornecedores ou laboratórios.

No decorrer do estágio, tive oportunidade de conferir os prazos de validades diversas vezes, o que contribuiu para me familiarizar com a maneira como a farmácia se organiza a nível do armazenamento e disposição dos seus produtos, bem como para o contacto com os diversos tipos de medicamentos e produtos de saúde existentes, mesmo aqueles com menor procura.

5. Interação Farmacêutico – Utente - Medicamentos

5.1. Atendimento ao Público

O momento da interação entre o farmacêutico e o utente tem especial importância em FC uma vez que é na farmácia que ocorre, habitualmente, tanto o primeiro contacto do utente com um profissional de saúde, como o último contacto, antes do início da terapêutica. Assim, para que o farmacêutico consiga estar à altura do aconselhamento que o utente merece, para além dos conhecimentos científicos, tem de se reger por princípios éticos e ser munido de estratégias de comunicação que lhe permitam adaptar a sua postura e linguagem ao nível sociocultural do utente. Neste contexto, é importante que o farmacêutico tire partido da relação privilegiada que mantém com os utentes, para fazer a diferença noutras vertentes, como na educação e promoção para a saúde. Por fim, é essencial que o farmacêutico respeite sempre o sigilo profissional a que é obrigado por lei. [55], [57]

No caso da FSMC, a maioria dos utentes que a frequentam, fazem-no de maneira regular, o que facilita as relações de proximidade, importantes para construção da confiança entre o profissional de saúde e o utente. Predomina uma população idosa, na sua maioria, polimedicada e com múltiplas patologias, o que requer especial atenção por parte do farmacêutico no que diz respeito ao acompanhamento farmacoterapêutico. Neste sentido, o farmacêutico pode ajudar a evitar problemas relacionados com a medicação, que são um risco particular para o idoso. Para além disso, há que ter em conta que nesta população, o nível de literacia, é normalmente, baixo, sendo preciso transmitir as ideias da forma mais clara possível, acompanhando a transmissão da informação oral, com informação escrita e sob a forma de pictogramas ou imagens. É igualmente importante garantir que o utente não deixa a farmácia com dúvidas relativas ao tratamento, uma vez que, pode condicionar a adesão ao mesmo. Uma das técnicas que mais feedback positivo me deu foi solicitar ao utente que repetisse os pontos chave da informação que tinha sido passada nesse

atendimento. Desta forma consegui detetar com mais brevidade e eficácia as falhas de compreensão presentes e adaptar o meu discurso.

No presente estágio, desde cedo que me foi dada a possibilidade de assistir aos atendimentos efetuados pela equipa da FSMC, o que me permitiu assimilar as diferentes ferramentas aplicadas na interação com os utentes, com o objetivo de satisfazer as necessidades individuais de cada um e, com isso, ganhar confiança para as pôr em prática posteriormente. No entanto, e apesar do apoio constante que me foi dado por parte de toda a equipa, o atendimento ao público demonstrou ser a parte do estágio que mais desafios me trouxe. O atendimento apresenta uma complexidade tal que para além de ser necessário pôr em prática os conhecimentos científicos transmitidos ao longo do curso, exige um grande nível de empatia para com os utentes, o que está dependente das particularidades apresentadas por cada indivíduo. Porém, com a prática do dia-a-dia na FC, adquire-se um maior à vontade e a naturalidade inerente ao processo acaba por ser alcançada.

Devido à situação pandémica e às medidas adotadas em consequência da mesma, principalmente, o uso de máscara, a colocação de acrílicos nos balcões de atendimento e o distanciamento social, o atendimento ao público tornou-se um desafio ainda maior. Conseguir transmitir as ideias oralmente ficou mais complicado, demonstrando a importância que há em recorrer a outros métodos para reforçar a informação oral, tais como, a etiquetagem das embalagens com a posologia e a entrega de folhetos informativos complementares. Neste sentido, durante o meu estágio fui incentivada a elaborar folhetos com informação inerente aos passos para uma administração correta das diversas formas farmacêuticas existentes e os quais tive oportunidade de entregar e expor a informação neles contida a alguns utentes no seguimento de questões colocadas durante o atendimento, nomeadamente para administração de insulina. (Anexo 1)

5.2. Farmacovigilância

A Farmacovigilância é, de acordo com as BPF para a FC, a atividade de saúde pública que tem por objetivo a identificação, quantificação, avaliação e prevenção dos riscos associados ao uso dos medicamentos em comercialização, permitindo o seguimento dos possíveis efeitos adversos dos medicamentos [55].

O farmacêutico, devido à proximidade com o utente, deve não só dar especial importância à deteção e notificação de reações adversas (RAM), como incentivar os utentes a estarem atentos e a proceder eles próprios à notificação. Esta notificação deve ser submetida ao Sistema Nacional de Farmacovigilância com a maior brevidade possível, diretamente via email, correio ou telefone, ou através do Portal RAM.

A informação recolhida através destas notificações, é essencial para garantir a monitorização contínua eficaz da segurança dos medicamentos existentes no mercado, permitindo identificar potenciais reações adversas desconhecidas, quantificar e/ou melhor caracterizar reações adversas previamente identificadas e implementar medidas que permitam minimizar o risco da sua ocorrência [60].

No decorrer do estágio, tive oportunidade de fazer a notificação de uma suspeita de RAM, em conjunto com a diretora técnica. A mesma foi submetida através do Portal RAM e dizia respeito a um caso de um adulto, do sexo masculino, que apresentou rabdomiólise associada à utilização de atorvastatina, sendo-lhe atribuída uma relação de causalidade possível.

5.3. VALORMED – Reciclagem de Medicamentos

No âmbito da promoção da sustentabilidade ambiental, a FSMC dispõe de um contentor VALORMED na zona de atendimento que permite a recolha das embalagens vazias e medicamentos fora de uso ou de prazo de validade, com o objetivo de serem reciclados e devidamente eliminados, de modo a minimizar o impacto que os resíduos de embalagens e medicamentos podem vir a causar sobre o ambiente. Este projeto tem ainda o objetivo de sensibilizar para a não acumulação de medicamentos nos domicílios e de evitar a automedicação indevida. [61]

O farmacêutico, durante o ato da dispensa, assume o papel fundamental de sensibilizar os utentes para a correta gestão dos resíduos medicamentosos, informando da necessidade de serem devolvidas na farmácia as embalagens vazias e dos medicamentos fora de uso ou de prazo de validade. A aceitação por parte do utente deste tipo de programas, passa bastante pela presença forte de uma voz educacional e não autoritária, que explica a razão pela qual certa ação deve ser feita. Aprendi isto ao longo do meu estágio. No início apenas informava os utentes que deviam trazer as embalagens vazias e fora de prazo para serem recicladas. Com o passar do tempo entendi que ao explicar aos utentes (especialmente aos mais idosos) que a reciclagem destes produtos e medicamentos faz com que por exemplo, os solos e rios fiquem menos poluídos e, por consequência, as produções agrícolas e os animais não sejam afetados nem alvo de toxicidade, a adesão ao programa VALORMED aumentava. A reciclagem e a preocupação com o ambiente não são ideias do século XXI, as gerações passadas sempre tiveram cuidado com o planeta, a forma como expomos a informação especialmente a esta faixa etária mais idosa, é que identifica o sucesso e aceitação do programa.

Os contentores VALORMED, uma vez cheios, são selados e registados no sistema. De seguida, são recolhidos pelo distribuidor de medicamentos que, no caso da FSMC, se trata da *Alliance Healthcare*, que irá proporcionar a chegada dos mesmos a centros de triagem, onde irão receber o devido tratamento.

6. Dispensa de Medicamentos

Um medicamento, de acordo com o Artigo 3º do Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto, devidamente modificado pelo Decreto-Lei n.º 112/2019 de 16 de agosto, é toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas [62].

A dispensa de medicamentos é, segundo as BPF para a FC, o ato profissional em que o farmacêutico, após avaliação da medicação, cede medicamentos ou substâncias medicamentosas aos utentes mediante prescrição médica ou em regime de automedicação ou indicação farmacêutica, acompanhada de toda a informação indispensável para o correto uso dos medicamentos [55]. A dispensa de medicamentos começa pela receção da prescrição e confirmação da sua validade/autenticidade, seguindo-se da avaliação da farmacoterapêutica prescrita, com o objetivo de identificar e resolver problemas relacionados com os medicamentos, protegendo assim o utente de possíveis resultados

negativos provenientes da toma da medicação [55]. Por último, é entregue o medicamento/produto prescrito e dadas as informações clínicas, importantes para garantir que o utente retira o máximo benefício do tratamento [55].

No que concerne à dispensa, os medicamentos podem classificar-se segundo a necessidade ou não de receita médica. Os MSRM são todos aqueles que, de acordo com o artigo 114.º do Decreto-Lei n.º 176/2006, possam constituir algum risco para a saúde do utente e que desta forma, necessitam de vigilância médica, sendo que na sua maioria, são comparticipados pelo Serviço Nacional de Saúde (SNS) [62]. O mesmo Decreto-Lei, no artigo 115.º, devidamente alterado pelo Decreto-Lei n.º 128/2013 de 5 de setembro, indica que os MNSRM são todos os que não estejam contemplados no artigo 114.º, não sendo comparticipados pelo Estado, salvo nos casos previstos na legislação [62].

6.1. Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

6.1.1. Receita Médica

A receita médica, sendo condição para que o utente tenha acesso ao tratamento que inclui MSRM, torna-se particularmente importante no ato da dispensa. Deste modo, para facilitar o processo e aumentar a segurança do mesmo, surgiu legislação que prevê a desmaterialização de todo o circuito, desde a prescrição, à dispensa e conferência, através do recurso a soluções ou equipamentos informáticos reconhecidos pelos Serviços Partilhados do Ministério da Saúde (SPMS) [63].

Atualmente, coexistem duas formas de prescrição: manuais e eletrónicas, sendo que estas últimas poderão ser desmaterializadas ou materializadas.

6.1.1.1. Validação da Receita

Independentemente do modo de disponibilização da prescrição, há um conjunto de informações de presença obrigatória, que são transversais a todos os modelos e as quais devem ser validadas aquando da receção da receita, de forma a assegurar a autenticidade da mesma. São informações essas a numeração única atribuída à receita; o local de prescrição; a identificação do médico prescriptor e do utente; a entidade financeira responsável; a identificação do medicamento; a posologia e duração do tratamento; participações especiais e a data de prescrição.

No que diz respeito à identificação do medicamento, esta é feita obrigatoriamente por Denominação Comum Internacional (DCI) da substância ativa; forma farmacêutica; dosagem; apresentação; posologia e número de embalagens.

A prescrição de medicamentos é efetuada por DCI, com vista a centrar a prescrição médica na escolha farmacológica e, assim, contribuir para uma utilização mais racional dos medicamentos. No entanto, estão previstas exceções que permitem a prescrição por marca ou titular de AIM, no caso de medicamentos com substância ativa para a qual não exista medicamento genérico comparticipado ou para a qual só exista original de marca e licenças; medicamentos que, por razões de propriedade industrial, apenas podem ser prescritos para determinadas indicações terapêuticas e ainda quando o prescriptor justifica o impedimento para a substituição. Neste último caso, as justificações possíveis de ser apresentadas são: exceção a) medicamentos com margem ou índice terapêutico estreito, identificados em lista

definida pelo INFARMED; exceção b) reação adversa prévia reportada ao INFARMED, e exceção c) tratamento com duração superior a 28 dias [63], [64].

Não obstante o supramencionado, existem especificidades inerentes a cada modelo de prescrição, que condicionam a sua validação e que são igualmente importantes de ser referidas.

No que concerne à prescrição eletrónica desmaterializada, esta é acessível através de equipamentos eletrónicos e contém obrigatoriamente a assinatura digital do médico prescriptor, a hora de prescrição e as linhas de prescrição devem estar identificadas com a sua tipologia e número, conter o tipo de medicamento ou produto de saúde prescrito, assim como a data do seu termo de vigência. Cada linha de prescrição pode conter 2 embalagens, no caso de medicamentos destinados a tratamentos de curta ou média duração, com uma validade de 60 dias, ou 6 embalagens, no caso de medicamentos destinados a tratamentos de longa duração, com uma validade de 6 meses. [63], [64]

A prescrição eletrónica materializada permite a prescrição até 4 medicamentos distintos, num total de 4 embalagens por receita, sendo que no máximo, podem ser prescritas 2 embalagens por medicamento. Este modelo de prescrição é válido durante 30 dias, e poderá ser renovável até 6 meses, no caso de medicamentos destinados a tratamentos de longa duração. Por este motivo, as receitas renováveis podem ter até três vias, devendo constar na mesma a indicação do número da via. Neste modelo, o registo e validação da receita é feito através da Base de Dados Nacional de Prescrições (BDNP), sendo posteriormente impressa e obrigatoriamente assinada manualmente pelo médico prescriptor. [63], [64]

Relativamente à prescrição manual, o seu uso é de carácter excecional e tem de ser justificado de acordo com os casos previstos no artigo 5º da Portaria n.º 224/2015 de 27 de julho, alterado pelo artigo 2º da Portaria n.º 390/2019 de 29 de outubro, que incluem falência informática, inadaptação do prescriptor e prescrição no domicílio, com um máximo de 40 receita por mês [64]. Uma vez que este tipo de modelo requer uma verificação manual, é necessário redobrar os cuidados na sua validação, devendo constar na receita a justificação para recorrer ao modelo manual, a vinheta identificativa do médico prescriptor, o local de prescrição e a especialidade médica. Em termos de validade, número de embalagens permitido e assinaturas do médico, as normas a seguir são semelhantes às receitas eletrónicas materializadas. Quando são destinadas a um utente abrangido por um regime especial de comparticipação, devem conter a letra “R”, no caso de pensionista, ou, a letra “O” acompanhada da menção do despacho referente ao regime em causa, no caso de outro regime especial. É importante referir que as receitas não devem conter rasuras, caligrafias e canetas diferentes, nem serem escritas a lápis, com consequência de não comparticipação das mesmas. [63]

O modelo de prescrição com o qual tive menor contacto foi este último de receitas manuais, visto que estão cada vez mais em desuso, principalmente após o surgimento do Despacho n.º 2935-B/2016 de 25 de fevereiro, que tornou obrigatória a prescrição através da receita eletrónica desmaterializada [65]. Para além disso, apresentam a grande desvantagem de a sua interpretação estar dependente da letra do médico prescriptor, o que pode induzir a erros na dispensa. Em caso de dúvidas, é importante contactar o médico prescriptor no sentido de esclarecer as mesmas. No decorrer do meu estágio tive a oportunidade de assistir a pelo menos 2 contactos desta natureza, os quais se revelaram fundamentais para confirmar a medicação prescrita.

6.1.1.2. Processamento da Receita

Após a verificação e validação da receita, segue-se o processamento da mesma, com recurso ao sistema informático, que varia consoante o tipo de prescrição.

No caso das receitas eletrónicas, procede-se à leitura ótica do código de barras, quando o utente possui a guia de tratamento impressa, ou introduz-se manualmente, quando se encontra em registo eletrónico, seguida da introdução do código de acesso e dispensa. Com isto, o sistema reconhece automaticamente a receita, ficando a prescrição disponível, conjuntamente com o regime de comparticipação abrangente do utente. Nas receitas eletrónicas desmaterializadas, o utente tem a possibilidade de fracionar a dispensa. Quando seja possível o utente escolher o medicamento, e no caso de o mesmo apresentar um PVP superior ao que consta na receita, é necessário introduzir o código de opção que garante que o direito de opção é concedido e usufruído pelo utente.

No que diz respeito às receitas manuais, a introdução dos medicamentos a dispensar e dos regimes de comparticipação aplicados é feita manualmente, de acordo com o indicado na prescrição. De seguida, é lido o código de barras de identificação da receita, bem como as vinhetas que a constituem. Visto que estas receitas carecem de processamento manual, aquando da finalização da dispensa, é necessário imprimir o documento de faturação no verso da receita, de acordo com o organismo de comparticipação. Neste documento consta a informação da farmácia, os detalhes da dispensa e ainda um espaço destinado a ser assinado pelo utente, ou representante, de forma a confirmar que lhe foram dispensados os medicamentos que constam na receita e que exerceu o seu direito de opção. Este deve ainda ser assinado, datado e carimbado, pelo farmacêutico responsável pela dispensa. Estas receitas são colocadas em local designado para o receituário do mês atual, que posteriormente são conferidas e submetidas na faturação mensal, de maneira a assegurar o reembolso das comparticipações efetuadas.

6.1.1.3. Dispensa do Medicamento/Produto Prescrito

No momento da dispensa, é importante que o farmacêutico faça uma avaliação farmacoterapêutica da prescrição, de maneira a identificar possíveis interações e inadequações do regime terapêutico. Para isso, é importante a comunicação com o utente no sentido de avaliar a pertinência da prescrição, se se encontra adequada ao utente ou se existem contraindicações, devendo ainda avaliar a adequação da posologia e, por último, as condições do utente relativamente à administração dos medicamentos. Em caso de dúvida, o farmacêutico deve recorrer a fontes de informação ou contactar o médico prescriptor para resolver os eventuais problemas detetados. [55]

Quando o utente tem possibilidade de escolha, o farmacêutico tem obrigação de o informar relativamente à existência do medicamento similar ao prescrito, que apresenta preço mais baixo. Neste sentido, está definido por lei que a farmácia deve dispor, no mínimo, de três dos cinco medicamentos com preço mais baixo, pertencentes ao mesmo grupo homogéneo, e, exceto nos casos em que o utente exerça o seu direito de opção, o farmacêutico deve dispensar aquele que for o mais barato. [63]

O ato da dispensa finaliza com o processo de conferência da medicação dispensada, verificando se corresponde ao prescrito, relativamente à substância ativa, dosagem, apresentação e número de embalagens, com especial atenção ao estado das mesmas e ao prazo de validade. A dispensa deve ser complementada com a transmissão ao utente, das

informações necessárias para um uso responsável do medicamento adequando o discurso ao nível sociocultural do mesmo. A informação oral deve ser reforçada por escrito ou com material de apoio adequado. [55]

6.1.2. Medicamentos Sujeitos a Receita Médica Especial

Os medicamentos sujeitos a receita médica especial são, de acordo com o Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de agosto, aqueles que preenchem pelo menos um dos seguintes critérios: contêm, em dose sujeita a receita médica, uma substância classificada como estupefaciente ou psicotrópico; possam, em caso de utilização anormal, dar origem a riscos importantes de abuso medicamentoso, criar toxicod dependência ou ser utilizados para fins ilegais; ou contêm uma substância que, pela sua novidade ou propriedades, se considere, por precaução, dever ser incluída nas situações previstas anteriormente [62].

Dentro deste grupo incluem-se os Medicamentos Estupefacientes e Psicotrópicos (MEP), sendo estes todos aqueles que contêm substâncias constantes nas tabelas I e II do Decreto-Lei n.º 15/93 de 22 de janeiro, e no n.º 1 do artigo 86º do Decreto-Regulamentar n.º 61/94 de 12 de outubro [66], [67].

Relativamente à prescrição, nas receitas eletrónicas materializadas ou manuais, os MEP têm de ser prescritos isoladamente, ou seja, a receita não pode incluir outros medicamentos ou produtos de saúde. Tratando-se de um grupo farmacológico que carece de especial atenção, o processo de dispensa tem um controlo mais rigoroso, pelo que, o sistema informático não permite, para qualquer modelo de receita, concluir a venda sem o preenchimento dos dados do adquirente, nomeadamente, nome, data de nascimento, n.º do documento de identificação pessoal, data de validade do documento e morada. Finalizada a venda, é emitido um talão com os dados associados à dispensa que é anexado à cópia da receita, caso esta seja materializada ou manual, e arquivado na farmácia. [63], [64]

Mensalmente, é obrigatório por parte da farmácia, o envio ao INFARMED de toda a documentação relativa a este grupo de medicamentos, incluindo o registo de saídas e a cópia das receitas. Esta documentação deve ainda permanecer arquivada na farmácia pelo período de 3 anos, ordenada cronologicamente. [64]

6.1.3. Regimes de Participação

O processo de participação dos medicamentos contribui para a diminuição de encargos dos utentes, uma vez que uma percentagem do preço dos medicamentos é suportada por uma entidade financeira específica, encarregando-se o utente de pagar apenas a diferença correspondente.

Atualmente, a legislação prevê que os medicamentos possam ser participados pelo Estado através de um regime geral ou de um regime excecional.

No regime geral, o Estado participa segundo um sistema de escalões, que varia consoante a classificação farmacoterapêutica dos medicamentos, e que inclui o escalão A correspondente a uma participação de 90%, o escalão B, de 69%, o escalão C, de 37%, e o escalão D, de 15% [63], [68].

No regime excecional, a participação aplica-se a situações específicas que abrangem determinadas patologias ou grupos de utentes, a especialidade clínica do médico prescriptor

e a forma como é feita a prescrição, uma vez que é obrigatório referir no campo da receita destinado à identificação do medicamento, o diploma legal que regulamenta o regime excecional em causa. Nestes casos, existe um acréscimo à participação do regime geral como é exemplo dos pensionistas que receberam no ano anterior menos de 14x o valor do salário mínimo nacional, em que no escalão A, há um aumento de 5% da participação e nos restantes escalões, de 15%. [63], [69]

Não obstante, existe ainda a participação específica de certos grupos de medicamentos e produtos de saúde como é o caso dos medicamentos manipulados, dos produtos destinados ao autocontrolo da Diabetes Mellitus; dos produtos dietéticos com carácter terapêutico; das câmaras expansoras e dos dispositivos médicos de apoio a utentes ostomizados e/ou com incontinência/retenção urinária [63].

Para além do Estado, há outros organismos de participação, que surgem como modelo de complementaridade e que participam uma percentagem adicional dos medicamentos, consoante o acordado por cada um. São exemplos destes organismos o sindicato dos bancários, a caixa geral de depósitos, a EDP, entre outros. No ato da dispensa, os utentes que beneficiem destes subsistemas, têm obrigatoriamente de apresentar o cartão comprovativo do mesmo. No final da dispensa, o sistema emite um talão que deve ser rubricado pelo utente e arquivado na farmácia para posteriormente ser processado no fim do mês, juntamente com o receituário.

Os próprios laboratórios podem igualmente contribuir com a participação de alguns produtos que comercializam. Neste caso, o sistema exige a leitura ótica de um código QR específico que se encontra na cartonagem externa do medicamento.

Durante o estágio, pude contactar com a maioria dos regimes de participação existentes, sendo que o SNS constitui a generalidade. Pela frequência com que ocorre na FSMC, é de destacar o regime excecional para utentes do SNS, pensionistas ou futuros pensionistas, abrangidos pelo Fundo Especial de Segurança Social do Pessoal da Indústria dos Lanifícios, que beneficiam da participação a 100% do preço dos medicamentos participados [70].

Menos frequentemente, surgiram casos em que me foi solicitada a cópia da receita médica e da respetiva fatura, com o objetivo de pedir o reembolso da despesa no Centro de Saúde, usufruindo assim do Complemento Solidário para Idosos. Este complemento é um apoio mensal concedido pela Segurança Social a idosos com poucos recursos, financiando em 50% o preço dos medicamentos não participados pelo Estado [71].

6.1.4. Operação Luz Verde

A Operação Luz Verde é um programa de dispensa de medicamentos hospitalares em farmácias comunitárias e ao domicílio, que surgiu em resposta à pandemia COVID-19 com o objetivo de proteger os utentes, evitando a sua deslocação aos hospitais apenas para aceder aos medicamentos e com isto garantir a continuidade do tratamento.

A partir do momento que a farmácia aceita ser intermediário no processo de dispensa de medicamentos hospitalares, quando recebe o “kit” de medicamentos, deve verificar as condições de armazenamento, os dados do destinatário e se a terapêutica corresponde à referida na informação que acompanha o “kit”. De seguida, o utente é contactado para informar que a medicação já se encontra disponível na farmácia, agendando-se a dispensa, que tanto pode ser presencial na farmácia, como entregue no domicílio através do serviço

de entregas da farmácia. Os utentes associados a este serviço, têm no sistema informático um separador especial de “acompanhamento farmacoterapêutico”.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de assistir ao processo de receção e dispensa de um “kit” de medicação proveniente do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra destinado a um utente inserido no programa.

6.2. Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

6.2.1. Automedicação e Aconselhamento Farmacêutico

A automedicação é o uso do MNSRM por iniciativa própria dos utentes ou por indicação farmacêutica. Esta prática apenas é recomendada para tratamento de sintomas e condições que não requeiram parecer médico, sendo que, essas situações são autolimitantes e tratadas num período curto de tempo. Porém, é importante que o utente esteja ciente de que o ato de se automedicar é sempre passível de gerar riscos, podendo mascarar sintomas, dificultar ou atrasar diagnósticos e as suas respetivas soluções terapêuticas, promover o aparecimento de efeitos adversos ou ainda o desenvolvimento de interações medicamentosas. Os riscos são mitigados sempre que se segue as informações do folheto informativo e/ou as fornecidas pelo farmacêutico. As situações passíveis de automedicação encontram-se listadas no Despacho n.º 17690/2007, de 23 de julho [72].

O papel do farmacêutico nestas situações passa por, através do diálogo com o utente, reunir informações acerca do seu problema. Para isso, pode ser útil utilizar mnemónicas que garantam que todas as questões essenciais são feitas ao utente. Uma dessas mnemónicas que me foi dada a conhecer durante o estágio e a qual pus mais em prática, foi a do *SIT DOWN SIR*. Neste caso, as perguntas a ser feitas incluem o **Sítio** ou localização de um sinal/sintoma; **Intensidade** ou gravidade; **Tipo** ou natureza; **Duração**; **Onset**, isto é, o início; **With**, se é acompanhado de outros sintomas; **aNnoyed**, o que é que irrita ou agrava o problema; **Spred**, a propagação; **Incidência** ou frequência; **Relieved**, aliviado por. É igualmente importante perceber se já houve algum tipo de automedicação para o problema em causa, bem como as patologias concomitantes e a medicação feita habitualmente. Posteriormente, o farmacêutico deve fazer uso dos seus conhecimentos científicos para, em conjunto com o utente, escolher o tratamento mais adequado, com respetivo aconselhamento, e disponibilizando toda a informação que considere necessária. Nas situações que não se encontram listadas como sendo passíveis de automedicação, incluindo situações clínicas mais graves, o farmacêutico deve encaminhar o utente ao médico. [55]

Dentro da classe de MNSRM, existem os de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF) que embora possam ser dispensados sem prescrição médica, a respetiva dispensa é condicionada à intervenção do farmacêutico e aplicação de protocolos de dispensa. Estes protocolos específicos de dispensa contribuem para assegurar o uso responsável do medicamento e permitem ao farmacêutico intervir na promoção do medicamento, assim como, assegurar a segurança da sua utilização. [73]

Devido à situação pandémica, a procura de MNSRM aumentou numa tentativa, por parte dos utentes, de aliviar certos sintomas, devido à impossibilidade de recorrer a consultas médicas, bem como de evitar as urgências médicas. Neste contexto, tornou-se ainda mais importante a avaliação correta de cada caso, de maneira a tentar compreender a necessidade de referenciação ao médico.

7. Aconselhamento e Dispensa de Outros Produtos de Saúde

7.1. Produtos de Dermofarmácia, Cosmética e Higiene

Um produto cosmético define-se, segundo o Decreto-Lei n.º 189/2008 de 24 de setembro, como qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as diversas partes superficiais do corpo humano, designadamente epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos, ou com os dentes e as mucosas bucais, com a finalidade de exclusiva ou principalmente, os limpar, perfumar, modificar o seu aspeto, proteger, manter em bom estado ou de corrigir odores corporais [74]. Com isto, é possível concluir que fazem parte desta categoria, produtos como cremes hidratantes, géis de limpeza, produtos capilares, desodorizantes, batons, perfumes, pastas dentífricas, entre outros. Após comercialização, os cosméticos são controlados pelo INFARMED.

Nos últimos anos o mercado da dermocosmética tem sofrido um crescimento exponencial, de maneira que a oferta passou a ser tal que se o farmacêutico não aposta numa formação contínua no assunto, torna-se difícil garantir um aconselhamento de qualidade. A exigência da população relativamente a este tipo de produtos também se intensificou, procurando não só um produto que seja eficaz, mas que tenha também a melhor qualidade possível. Assim, é importante que o farmacêutico para além de conseguir diferenciar um problema capaz de ser resolvido usando estes produtos, de um problema que necessite de observação médica, esteja devidamente preparado para orientar na escolha e aconselhamento do produto mais adequado às necessidades de cada um dos seus utentes.

Estes produtos ocupam grande parte da zona de atendimento da FSMC e integram frequentemente as promoções e campanhas em vigor, sendo que os que têm maior procura são os de higiene oral, destacando-se a fixação e limpeza de próteses, bem como produtos de limpeza e hidratação facial de gamas para problemas específicos, como a pele atópica.

7.2. Produtos Dietéticos para Alimentação Especial

Os produtos dietéticos para alimentação especial, segundo o Decreto-Lei n.º 74/2010, de 21 de junho, constituem uma classe de géneros alimentícios diferente dos alimentos de consumo corrente, pois a sua composição ou processo de fabrico torna-os particularmente adequados às necessidades nutricionais de certos grupos de pessoas. Nestes grupos, enquadram-se pessoas cujo processo de assimilação ou metabolismo se encontre perturbado, pessoas com condições fisiológicas que podem beneficiar de uma ingestão controlada de certas substâncias contidas nos alimentos, e lactentes ou crianças de pouca idade em bom estado de saúde [75]. Atualmente, o Gabinete de Planeamento e Políticas responsabiliza-se pelas medidas relativas à sua qualidade e segurança.

No que concerne à FSMC, estes produtos têm particular procura pela população idosa que necessita de um aporte de proteína e energia superior devido à perda da massa muscular, presença de doenças crónicas e alterações do metabolismo específicas do envelhecimento. Por forma a satisfazer tal procura, existem expostos alguns suplementos nutricionais orais hiperproteicos, hipercalóricos ou ambos, assim como espessantes que permitem adaptar as

texturas dos sólidos e espessar os líquidos, de marcas como Fortimel[®], Resource[®] ou Meritene[®].

7.3. Produtos Dietéticos Infantis

A OMS recomenda que os lactentes sejam exclusivamente amamentados durante os primeiros 6 meses de idade, devendo a amamentação manter-se a par da diversificação alimentar e durante a introdução na dieta familiar, ou seja, até aos 12-24 meses [76]. No entanto, nas situações em que a amamentação não é possível ou em que a mulher decide não o fazer, deve garantir-se o aporte nutricional adequado do bebé, através de produtos dietéticos destinados à nutrição infantil.

Desta forma, existem diversos leites e fórmulas infantis especialmente desenvolvidos para satisfazer as necessidades nutricionais dos bebés etapa a etapa, como as fórmulas para lactentes, utilizadas nos primeiros 6 meses de vida; as fórmulas de transição, dos 4 aos 12 meses, quando são introduzidos os alimentos sólidos; e os leites de crescimento ou continuação, dos 12 meses aos 36 meses. Existem, ainda, os leites especiais, desenvolvidos para necessidades nutricionais específicas como prematuridade, problemas intestinais, intolerâncias e alergias alimentares.

Tendo em conta que a população alvo da FSMC é maioritariamente geriátrica, não existe muita procura de produtos dietéticos infantis. Contudo, existem disponíveis alguns dos produtos supramencionados e ainda outros produtos de puericultura, como tetinas, biberons, chupetas e produtos de higiene para muda da fralda.

7.4. Fitoterapia e Suplementos Nutricionais

A fitoterapia é uma terapia não convencional fundamentada no uso de medicamentos à base de plantas que, de acordo com o Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto, entende-se por qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas [62].

O farmacêutico tem o papel fundamental de advertir os utentes para os riscos do uso deste tipo de medicamentos, principalmente de potenciais interações com outros fármacos, uma vez que há uma tendência para os achar inofensivos pela sua origem “natural”. Na FSMC a procura deste tipo de produtos não é frequente pelo que não existe muita variedade nem quantidade em stock.

Por outro lado, os nutracêuticos ou suplementos alimentares, segundo o Decreto-Lei n.º 136/2003 de 28 de junho, tratam-se de géneros alimentícios que se destinam a complementar e/ou suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estremes ou combinadas, comercializadas em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida [77]. Estes encontram-se sob a alçada da Direção Geral da Alimentação e Veterinária (DGAV).

Não são medicamentos e, por isso, não podem alegar propriedades profiláticas, de prevenção ou cura de doenças, nem fazer referência a essas propriedades, no entanto, não se deve deixar que os suplementos alimentares sigam uma monitorização mais leve que os medicamentos, pois não são livres de efeitos adversos e por vezes pode mesmo existir interação entre ambos os produtos. Assim, continua a ser fundamental o papel do farmacêutico no aconselhamento dos mesmos.

No caso dos suplementos alimentares, na FSMC a sua procura é maior pelo que teve oportunidade de aconselhar e dispensar de maneira mais regular este tipo de produtos, sobretudo aqueles que visam combater situações de stress, de fadiga física e mental, e os que fortalecem o sistema imunitário.

7.5. Medicamentos de Uso Veterinário

Os MUV constituem, segundo o artigo 3º do Decreto-Lei n.º 148/2008 de 29 de julho, alterado pelo Decreto-Lei n.º 314/2009 de 29 de Outubro, toda e qualquer substância que apresenta propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser administrada com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário, ou exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica ou restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas [78]. À semelhança daquilo que se verifica nos medicamentos de uso humano, no que concerne à dispensa, os MUV podem, também, classificar-se segundo a necessidade ou não de receita médica veterinária.

Na FSMC, o stock de MUV é reduzido, uma vez que a procura não é acentuada, e destina-se principalmente a animais de companhia, estando limitado a alguns anticoncecionais e antiparasitários internos e externos. No momento da dispensa, o farmacêutico deve certificar-se que o medicamento é adequado ao animal em questão, nomeadamente para o peso e idade do mesmo.

7.6. Dispositivos Médicos

Os dispositivos médicos (DM) são importantes instrumentos de saúde utilizados para prevenir, diagnosticar ou tratar doenças humanas [79].

Estes dispositivos estão definidos pelo Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de junho, sendo classificados em três classes distintas, consoante o nível de risco inerente à sua utilização [80]. Existe ainda uma categoria específica de DM para diagnóstico *in vitro*, em que se incluem produtos como testes de gravidez, tiras de medição da glicémia, entre outros.

No que diz respeito aos DM mais frequentemente dispensados na FSMC, estes incluem dispositivos destinados à recolha de fluídos corporais como sacos coletores de urina, sacos de ostomia, fraldas e pensos para incontinência; dispositivos destinados à imobilização ortopédica e à aplicação de força/compressão; e ainda tiras de medição da glicémia.

8. Preparação de Medicamentos

8.1. Medicamentos Manipulados

Os medicamentos manipulados incluem, de acordo com a Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho, qualquer fórmula magistral (quando são preparados segundo uma receita médica) ou preparado oficial (quando são preparados segundo indicações compendiais, de uma Farmacopeia ou Formulário), preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico [81].

Apesar das vantagens que este tipo de preparação apresenta, como a possibilidade de individualização e personalização da terapêutica, a crescente industrialização do medicamento acaba igualmente por permitir responder a grande parte das necessidades de tratamento dos utentes, nas suas diversas dosagens e formulações. Neste sentido, hoje em dia, esta é uma atividade com pouca expressão na prática farmacêutica, de tal modo, que já não se pratica na FSMC. No entanto, a FSMC dispõe ainda das instalações e material necessário à preparação dos mesmos, de acordo com o exigido nas BPF para a FC [55].

9. Outros Cuidados de Saúde

Os serviços que podem ser prestados nas farmácias encontram-se definidos pelo artigo 2º da Portaria n.º 1429/2007, de 2 de novembro, devidamente alterado pelo artigo 2º da Portaria n.º 97/2018, de 9 de abril, estabelecendo ainda que as farmácias devem comunicar ao INFARMED os serviços que optem por prestar [82].

Como referido anteriormente, a ASMMC dispõe, em instalações adjacentes à farmácia, de um centro clínico e um gabinete de enfermagem onde são prestados serviços de medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, administração de medicamentos, entre outros. Por essa mesma razão, a FSMC não presta esse tipo de serviços à população.

9.1. Preparação e Distribuição de Medicação a Instituições

A FSMC é parte integrante de certos protocolos realizados entre a ASMMC e outras instituições sendo que o serviço que a farmácia presta passa pela preparação e distribuição de medicação para as mesmas. Assim, as instituições para as quais a FSMC presta este serviço são o Estabelecimento Prisional da Covilhã, a Casa do Menino Jesus, o Centro Social Paroquial do Sarzedo, a Santa Casa da Misericórdia de Belmonte e o Centro de Assistência Social do Dominguizo. A medicação é solicitada maioritariamente via email, juntamente com as receitas, e após a preparação da mesma, é realizada a entrega no local devido, sendo que de instituição para instituição a periodicidade varia, podendo ser de fornecimento diário, semanal ou mensal.

No caso das instituições do Dominguizo e do Sarzedo, o pedido é entregue na sua maioria através do sistema de preparação individualizada da medicação (PIM), que segundo a Ordem dos Farmacêuticos, consiste no serviço a partir do qual o farmacêutico organiza a medicação do utente, de acordo com a posologia prescrita, num dispositivo de múltiplos compartimentos e selado de forma estanque na farmácia [83]. Inclui-se ainda neste serviço

a informação, prestada sobre a forma escrita ou de pictogramas, tendo por objetivo auxiliar o utente na correta administração dos medicamentos e promover uma melhor adesão à terapêutica.

O sistema PIM é ainda utilizado para alguns utentes em regime de apoio domiciliário da ASMMC.

Por fim, a FSMC procede à preparação da medicação dos utentes pertencentes ao Lar e Centro de Dia da ASMMC, fazendo mensalmente a dispensa mediante pedido do gabinete de enfermagem, com as respetivas receitas.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de acompanhar e realizar por diversas vezes a preparação e dispensa de medicamentos para estas instituições, bem como de realizar PIM, sob supervisão atenta de um farmacêutico.

9.2. Entrega de Medicamentos ao Domicílio

Com o agravar da pandemia, surgiu a necessidade de a farmácia arranjar maneira de apoiar os grupos de risco, sobretudo os idosos, os doentes crónicos e os imunodeprimidos, incentivando ao isolamento social como modo de prevenção. Assim, surgiu a “Farmácia à sua porta” que consiste num serviço gratuito de entregas ao domicílio de medicamentos e de aconselhamento farmacêutico para os utentes sócios da ASMMC, residentes no concelho da Covilhã.

Para usufruir do serviço, os utentes têm de fazer o contacto com a farmácia, via email ou telefone, solicitando a medicação pretendida e/ou aconselhamento por parte do farmacêutico e fornecendo, se possível, os dados da receita médica, no caso dos MSRM. Posteriormente, é preparada a medicação e entregue no domicílio indicado pelo utente, cumprindo tanto o disposto na Portaria n.º 1427/2007, de 2 de novembro, como as normas da DGS, garantindo toda a segurança dos intervenientes [84].

No ato da entrega, o farmacêutico tem a oportunidade de prestar aconselhamento e de tirar todas as dúvidas relativas à medicação.

Durante o meu estágio tive oportunidade de acompanhar algumas das entregas de medicação feitas ao domicílio, inclusive a certas localidades mais isoladas nas zonas rurais do concelho da Covilhã, o que me permitiu concluir que é um dos serviços mais importantes que a farmácia presta pois possibilita que a medicação chegue a toda a gente, mesmo os que vivem mais isolados e os que têm mobilidade reduzida ou dificuldades com os transportes.

10. Contabilidade e Gestão

10.1. Conferência do Receituário e Faturação

O processamento mensal do receituário permite à farmácia receber o reembolso do montante relativo à comparticipação por parte dos diferentes organismos responsáveis.

Posto isto, no caso da FSMC, a diretora técnica procede à conferência do receituário no final do mês, o que inclui verificar a autenticidade das receitas e conferir o processamento das mesmas, de acordo com o descrito nos pontos 6.1.1.1. e 6.1.1.2. No caso de ser detetado algum erro, o mesmo deve ser corrigido, se possível, e devidamente justificado. De seguida,

as receitas são separadas por organismo de faturação e agrupadas de acordo com a numeração atribuída pelo sistema no documento impresso no verso das mesmas.

Posteriormente, com recurso ao sistema informático, procede-se ao loteamento do receituário, com um máximo de 30 receitas por lote. Quando um lote se encontra completo, é emitido o Verbete de Identificação do Lote, que detalha as receitas que o constituem e que é anexado a estas, após carimbado e assinado. Fechados todos os lotes, imprime-se a Relação Resumo de Lotes, assim como, a Fatura Mensal, em sextuplicado, que devem ser igualmente carimbados e assinados. Das 6 cópias da Fatura Mensal, 3 são enviadas para o organismo correspondente, 1 é arquivada na farmácia e 2 são enviadas para a contabilidade.

No caso das receitas desmaterializadas, o envio das próprias receitas e da fatura é feito eletronicamente, uma vez que o sistema gera automaticamente um único lote e procede à comunicação do mesmo.

O receituário cuja comparticipação está ao encargo do SNS, assim como toda a documentação associada, deve ser enviado até ao 10^o dia do mês seguinte para a Administração Regional de Saúde (ARS). No caso da comparticipação assegurada por outros organismos, o envio é dirigido à AFP, que funciona como intermediário entre a farmácia e os respetivos organismos.

Conferido o receituário, a farmácia é reembolsada no valor correspondente ao montante comunicado. No entanto, no caso de ser detetada alguma inconformidade com o receituário submetido, o mesmo é devolvido à farmácia, que tem a possibilidade de proceder à sua correção e de o voltar a submeter no mês seguinte, para nova conferência.

No decorrer do estágio, tive a oportunidade de acompanhar e participar em todas as etapas relativas a este processo incluindo a conferência, organização, faturação e envio do receituário. Com isto, pude constatar a importância associada ao mesmo, uma vez que, está dependente deste processo o reembolso do dinheiro das comparticipações, o qual representa a maioria do rendimento da farmácia.

11. Considerações Finais

O contexto atual que vivemos da pandemia COVID-19, fez com que os desafios da prática do ato farmacêutico se acentuassem e com isso, fica-se ainda mais visível o quão importante é o papel do farmacêutico na comunidade. As farmácias, à semelhança de outros serviços considerados essenciais, mantiveram-se, com as devidas precauções, sempre abertas ao público, contribuindo para reduzir a sobrecarga das unidades de urgência, bem como o risco de contaminação daqueles que as procuram. Pelo mesmo motivo, foram linha da frente no aconselhamento e tranquilização da comunidade relativamente às medidas a adotar para evitar a disseminação do vírus. A situação mostrou ainda que não só é importante a digitalização da farmácia, como aumentar a capacidade de entrega de medicamentos e prestação de serviços ao domicílio, de maneira a conseguir chegar a toda a comunidade, mesmo a mais debilitada.

O facto de o presente estágio ter tido lugar em circunstâncias tão atípicas, trouxe certamente novos desafios que, em condições normais, não teriam surgido. No entanto, permitiram-me testemunhar o quão multifacetado um farmacêutico tem de ser e como as suas competências pessoais acabam por se destacar das competências técnicas e científicas, quando é preciso

construir uma relação de confiança com os seus utentes, que faz com que recorram primeiro à farmácia, pela importância de ouvir a opinião do farmacêutico.

Ao longo do estágio pude constatar que a preparação teórica fornecida durante os cinco anos do MICEF, acaba por não ser suficiente quando confrontada com a realidade prática do dia-a-dia do farmacêutico comunitário e, por isso, considero que é um complemento extremamente importante da formação académica de um futuro farmacêutico. No entanto, graças à excelente equipa de profissionais que me recebeu na FSMC, para além da consolidação dos conhecimentos teóricos, tive a oportunidade de adquirir conhecimentos práticos que me permitiram crescer, não só a nível profissional, como a nível pessoal. O constante apoio que senti por parte de toda a equipa e a motivação que sempre me transmitiram, para querer aprender mais e fazer melhor, fizeram com que a experiência fosse extremamente positiva. Só tenho a agradecer toda a paciência e confiança que depositaram em mim, preparando-me para ser a profissional que a comunidade merece.

Referências Bibliográficas

Capítulo 1 - Bioatividade de extratos de *Echinacea purpurea*, um potencial ingrediente cosmético

- [1] A. Kumar Dwivedi Research Scholar, S. Satya Sai, D. Jhade Associate Professor, S. Satya, A. Kumar Dwivedi, and D. Jhade, “Cosmetic potential of selected medicinal plants: A review,” ~ 381 ~ *J. Pharmacogn. Phytochem.*, vol. 10, no. 4, 2021, Acedido: Oct. 05, 2021. [Online]. Disponível: www.phytojournal.com.
- [2] N. Halla *et al.*, “Cosmetics preservation: A review on present strategies,” *Molecules*, vol. 23, no. 7, pp. 1–41, 2018, doi: 10.3390/molecules23071571.
- [3] K. Kindscher, “The Biology and Ecology of Echinacea Species,” in *Echinacea: Herbal Medicine with a Wild History*, K. Kindscher, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 47–54.
- [4] B. Fonseca-Santos, M. Antonio Corrêa, and M. Chorilli, “Sustainability, natural and organic cosmetics: consumer, products, efficacy, toxicological and regulatory considerations,” *Brazilian J. Pharm. Sci.*, vol. 51, no. 1, pp. 17–26, Jan. 2015, doi: 10.1590/S1984-82502015000100002.
- [5] M. S. Ferreira, M. C. Magalhães, R. Oliveira, J. M. Sousa-Lobo, and I. F. Almeida, “Trends in the use of botanicals in anti-aging cosmetics,” *Molecules*, vol. 26, no. 12, pp. 1–18, 2021, doi: 10.3390/molecules26123584.
- [6] A. Kerdudo *et al.*, “Development of a natural ingrediente - Natural preservative: A case study,” *Comptes Rendus Chim.*, vol. 19, no. 9, pp. 1077–1089, Sep. 2016, doi: 10.1016/j.crci.2016.06.004.
- [7] European Commission, “REGULATION No 1221/2009,” *Off. J. Eur. Union*, vol. 52, no. 342, 2009.
- [8] SCCS, “SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation 11th revision,” *SCCS (Scientific Comm. Consum. Safety)*, vol. SCCS/1628/, no. March, p. 151, 2021, [Online]. Disponível: http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdfhttp://ec.europa.eu/health/sites/health/files/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_o_190.pdf.
- [9] “ISO - ISO 22716:2007 - Cosmetics — Good Manufacturing Practices (GMP) — Guidelines on Good Manufacturing Practices.” <https://www.iso.org/standard/36437.html> (acedido a Dec. 07, 2021).
- [10] K. Nowak, E. Jabłońska, and W. Ratajczak-Wrona, “Controversy around parabens: Alternative strategies for preservative use in cosmetics and personal care products,” *Environ. Res.*, vol. 198, no. May 2020, 2021, doi: 10.1016/j.envres.2020.110488.
- [11] J. Krutmann, A. Bouloc, G. Sore, B. A. Bernard, and T. Passeron, “The skin aging exposome,” *J. Dermatol. Sci.*, vol. 85, no. 3, pp. 152–161, Mar. 2017, doi: 10.1016/J.JDERMSCI.2016.09.015.
- [12] S. Silva *et al.*, “Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics,” *Int. J. Cosmet. Sci.*, vol. 41, no. 4, pp. 378–386, 2019, doi: 10.1111/ics.12551.

- [13] I. Bogdan Allemann and L. Baumann, "Antioxidants used in skin care formulations," *Skin Therapy Lett.*, vol. 13, no. 7, pp. 5–9, Sep. 2008.
- [14] H. Masaki, "Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects," *J. Dermatol. Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 85–90, 2010, doi: 10.1016/j.jdermsci.2010.03.003.
- [15] M. Sharifi-Rad *et al.*, "Echinacea plants as antioxidant and antibacterial agents: From traditional medicine to biotechnological applications," *Phyther. Res.*, vol. 32, no. 9, pp. 1653–1663, 2018, doi: 10.1002/ptr.6101.
- [16] S. E. Binns, B. R. Baum, and J. T. Arnason, "A taxonomic revision of Echinacea (Asteraceae: Heliantheae)," *Syst. Bot.*, vol. 27, no. 3, pp. 610–632, 2002.
- [17] A. Manayi, M. Vazirian, and S. Saeidnia, "Echinacea purpurea: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods," *Pharmacogn. Rev.*, vol. 9, no. 17, pp. 63–72, 2015, doi: 10.4103/0973-7847.156353.
- [18] B. Barrett, "Medicinal properties of Echinacea: A critical review," *Phytomedicine*, vol. 10, no. 1, pp. 66–86, Jan. 2003, doi: 10.1078/094471103321648692.
- [19] A. Gurib-Fakim, "Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow," *Mol. Aspects Med.*, vol. 27, no. 1, pp. 1–93, 2006, doi: 10.1016/j.mam.2005.07.008.
- [20] L. Guz, A. Sopinska, and T. Oniszczuk, "Effect of Echinacea purpurea on growth and survival of guppy (*Poecilia reticulata*) challenged with *Aeromonas bestiarum*," *Aquac. Nutr.*, vol. 17, no. 6, pp. 695–700, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2095.2011.00873.x.
- [21] R. Fu, P. Zhang, Z. Deng, G. Jin, Y. Guo, and Y. Zhang, "Diversity of antioxidant ingredients among Echinacea species," *Ind. Crops Prod.*, vol. 170, no. May, p. 113699, 2021, doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113699.
- [22] C. Cao and K. Kindscher, "The Medicinal Chemistry of Echinacea Species," in *Echinacea: Herbal Medicine with a Wild History*, K. Kindscher, Ed. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 127–145.
- [23] J. Li, J. Li, and F. Zhang, "The immunoregulatory effects of Chinese herbal medicine on the maturation and function of dendritic cells," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 171, pp. 184–195, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2015.05.050.
- [24] R. Bruni, V. Brighenti, L. K. Caesar, D. Bertelli, N. B. Cech, and F. Pellati, "Analytical methods for the study of bioactive compounds from medicinally used Echinacea species," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 160, pp. 443–477, 2018, doi: 10.1016/j.jpba.2018.07.044.
- [25] J. L. Parsons, S. I. Cameron, C. S. Harris, and M. L. Smith, "Echinacea biotechnology: Advances, commercialization and future considerations," *Pharm. Biol.*, vol. 56, no. 1, pp. 485–494, Jan. 2018, doi: 10.1080/13880209.2018.1501583.
- [26] I. Stanisavljević, S. Stojičević, D. Veličković, V. Veljković, and M. Lazić, "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction," *Chinese J. Chem. Eng.*, vol. 17, no. 3, pp. 478–483, 2009, doi: 10.1016/S1004-9541(08)60234-7.
- [27] M. R. Rady, A. M. Aboul-Enein, and M. M. Ibrahim, "Active compounds and biological activity of in vitro cultures of some Echinacea purpurea varieties," *Bull. Natl. Res. Cent.*, vol. 42, no. 1, pp. 1–12, 2018, doi: 10.1186/s42269-018-0018-1.

- [28] K. O. Mohamed Sharif *et al.*, “Anticancer and biological properties of leaf and flower extracts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench,” *Food Biosci.*, vol. 41, no. March, p. 101005, 2021, doi: 10.1016/j.fbio.2021.101005.
- [29] M. Sharma, S. Vohra, J. T. Arnason, and J. B. Hudson, “*Echinacea*. Extracts Contain Significant and Selective Activities Against Human Pathogenic Bacteria,” <http://dx.doi.org/10.1080/13880200701734919>, vol. 46, no. 1–2, pp. 111–116, Jan. 2008, doi: 10.1080/13880200701734919.
- [30] J. B. Hudson, “*Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in Infectious Diseases,” *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2012, p. 16, 2012, doi: 10.1155/2012/769896.
- [31] M. L. Tsai, C. C. Lin, W. C. Lin, and C. H. Yang, “Antimicrobial, antioxidant, and anti-inflammatory activities of essential oils from five selected herbs,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 75, no. 10, pp. 1977–1983, 2011, doi: 10.1271/bbb.110377.
- [32] I. Orhan *et al.*, “Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox* subsp. *caucasicus* var. *caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida*,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 47, no. 6, pp. 1304–1310, 2009, doi: 10.1016/j.fct.2009.03.004.
- [33] L. Thygesen, J. Thulin, A. Mortensen, L. H. Skibsted, and P. Molgaard, “Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination,” *Food Chem.*, vol. 101, no. 1, pp. 74–81, Jan. 2007, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2005.11.048.
- [34] Y. L. Tsai, C. C. Chiu, J. Yi-Fu Chen, K. C. Chan, and S. D. Lin, “Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 143, no. 3, pp. 914–919, Oct. 2012, doi: 10.1016/J.JEP.2012.08.032.
- [35] R. C. Aarland *et al.*, “Studies on phytochemical, antioxidant, anti-inflammatory, hypoglycaemic and antiproliferative activities of *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* extracts,” *Pharm. Biol.*, vol. 55, no. 1, pp. 649–656, 2017, doi: 10.1080/13880209.2016.1265989.
- [36] J. Coelho *et al.*, “*Echinacea purpurea* (L.) moench: Chemical characterization and bioactivity of its extracts and fractions,” *Pharmaceuticals*, vol. 13, no. 6, pp. 1–16, 2020, doi: 10.3390/ph13060125.
- [37] N. E. El-Ashmawy, E. A. El-Zamarany, M. L. Salem, H. A. El-Bahrawy, and G. M. Al-Ashmawy, “In vitro and in vivo studies of the immunomodulatory effect of *Echinacea purpurea* on dendritic cells,” *J. Genet. Eng. Biotechnol.*, vol. 13, no. 2, pp. 185–192, Dec. 2015, doi: 10.1016/J.JGEB.2015.05.002.
- [38] F. M. da Cunha *et al.*, “Caffeic Acid Derivatives: In Vitro and In Vivo Anti-inflammatory Properties,” <http://dx.doi.org/10.1080/10715760400016139>, vol. 38, no. 11, pp. 1241–1253, Nov. 2009, doi: 10.1080/10715760400016139.
- [39] CLSI, *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 11th ed. CLSI standard M07*. 2018.
- [40] CLSI, *Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; 4th ed. CLSI standard M27*. 2017.
- [41] CLS, *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; 3rd ed. CLSI standard M38*. 2017.

- [42] “ISO - ISO 11930:2019 - Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.” <https://www.iso.org/standard/75058.html> (accedido a Dec. 07, 2021).
- [43] S. B. Kedare and R. P. Singh, “Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 48, no. 4, pp. 412–422, Aug. 2011, doi: 10.1007/S13197-011-0251-1.
- [44] P. Molyneux, “The use of the stable radical Diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,” vol. 26, Nov. 2003.
- [45] R. Scherer and H. T. Godoy, “Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method,” *Food Chem.*, vol. 112, no. 3, pp. 654–658, Feb. 2009, doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2008.06.026.
- [46] D. A. Scudiero *et al.*, “Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines,” *Cancer Res.*, vol. 48, no. 17, 1988.
- [47] ISO, “ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity,” 2009. <https://www.iso.org/standard/36406.html> (accedido a Jan. 30, 2021).
- [48] B. D. Sloley, L. J. Urichuk, C. Tywin, R. T. Coutts, P. K. T. Pang, and J. J. Shan, “Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different Echinacea species,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 53, no. 6, pp. 849–857, Feb. 2010, doi: 10.1211/0022357011776009.
- [49] S. Y. Chiou, J. M. Sung, P. W. Huang, and S. D. Lin, “Antioxidant, Antidiabetic, and Antihypertensive Properties of Echinacea purpurea Flower Extract and Caffeic Acid Derivatives Using in Vitro Models,” *J. Med. Food*, vol. 20, no. 2, pp. 171–179, Feb. 2017, doi: 10.1089/jmf.2016.3790.
- [50] H. Jukić, “Antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds of the extracts of Echinacea purpurea (L.),” *Bull. Chem. Technol. Bosnia Herzegovina*, vol. 44, no. June, pp. 43–52, 2015.
- [51] S. Georgieva, V. ChristovaBagdassarian, and M. Atanassova, “Comparative evaluation of the polyphenol composition and antioxidant capacity of propolis and Echinacea purpurea,” *J. Exp. Integr. Med.*, vol. 4, no. 1, p. 51, 2014, doi: 10.5455/JEIM.050913.OR.089.
- [52] F. Banica *et al.*, “Determination of the Total Polyphenols Content and Antioxidant Activity of Echinacea Purpurea Extracts Using Newly Manufactured Glassy Carbon Electrodes Modified with Carbon Nanotubes,” *Process. 2020, Vol. 8, Page 833*, vol. 8, no. 7, p. 833, Jul. 2020, doi: 10.3390/PR8070833.
- [53] E. Girsang *et al.*, “Antioxidant and antiaging activity of rutin and caffeic acid,” *Pharmaciana*, vol. 10, no. 2, p. 147, Jul. 2020, doi: 10.12928/PHARMACIANA.V10I2.13010.
- [54] E. Pinho, I. C. F. R. Ferreira, L. Barros, A. M. Carvalho, G. Soares, and M. Henriques, “Antibacterial potential of northeastern portugual wild plant extracts and respective phenolic compounds,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/814590.

Capítulo 2 - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

- [55] Ordem dos Farmacêuticos, Boas Práticas Farmacêuticas Para a Farmácia Comunitária. 2009.
- [56] Ordem dos Farmacêuticos, “Farmácia Comunitária.” <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/> (acedido a Jul. 14, 2021).
- [57] Decreto-Lei n.º 307/2007. Diário da República n.º 168/2007, Série I 2007-08-31.
- [58] Orientação n.º 011/2020. Infecção por SARS-CoV-2 (COVID-19). Medidas de prevenção da transmissão em estabelecimentos de atendimento ao público. 2020-03-17.
- [59] INFARMED IP, Circular Informativa 019/CD/100.20.200, de 15 de Fevereiro de 2015.
- [60] INFARMED IP, “Farmacovigilância.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/farmacovigilancia> (acedido a Jul. 14, 2021).
- [61] VALORMED, “CIDADÃO E COMUNIDADE: ValorMed.” <http://www.valormed.pt/paginas/12/cidadao-e-comunidade> (acedido a Jul. 12, 2021).
- [62] Decreto-Lei n.º 176/2006, Diário da República n.º 167/2006, Série I de 2006-08-30. 2006, pp. 6297–6383.
- [63] INFARMED IP, “Normas Relativas à Dispensa de Medicamentos e Produtos de Saúde. Versão 6.0 de 2019-10-10.” https://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Dispensa/4c1aea02-a266-4176-b3ee-a2983bdfe790 (acedido a Aug. 04, 2021).
- [64] Portaria n.º 224/2015. Diário da República n.º 144/2015, Série I de 2015-07-27.
- [65] Despacho n.º 2935-B/2016. Diário da República n.º 39/2016, 1º Suplemento, Série II de 2016-02-25.
- [66] Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro. Diário da República n.º 18, Série I-A de 1993-01-22.
- [67] Decreto-Regulamentar n.º 61/94, de 12 de Outubro. Diário da República n.º 236/1994, Série I-B de 1994-10-12.
- [68] Portaria n.º 195-D/2015. Diário da República n.º 125/2015, 1º Suplemento, Série I de 2015-06-30.
- [69] INFARMED IP, “Regimes Excepcionais de Participação.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/regimes-excepcionais-de-comparticipacao> (acedido a Aug. 04, 2021).
- [70] Portaria n.º 287/2016. Diário da República n.º 216/2016, Série I de 2016-11-10.
- [71] Segurança Social I.P, “Complemento Solidário para Idosos.” <https://www.seg-social.pt/complemento-solidario-para-idosos> (acedido a Aug. 09, 2021).
- [72] Despacho n.º 17690/2007. Diário da República n.º 154/2007, Série II de 2007-08-10.

- [73] INFARMED IP., Deliberação n.º 25/CD/2015, de 18 de Fevereiro de 2015.
- [74] Decreto-Lei n.º 189/2008. Diário da República n.º 185/2008, Série I 2008-09-24.
- [75] Decreto-Lei n.º 74/2010 de 21 de junho. Diário da República n.º 118/2010, Série I de 2010-06-21.
- [76] WHO, “Infant and young child feeding.” <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infant-and-young-child-feeding> (acedido a Jul. 08, 2021).
- [77] Decreto-Lei n.º 136/2003. Diário da República n.º 147/2003, Série I-A 2003-06-28.
- [78] Decreto-Lei n.º 148/2008. Diário da República n.º 145/2008, Série I 2008-07-29.
- [79] INFARMED IP, “Dispositivos médicos na farmácia.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/dispositivos-medicos> (acedido a Jul. 09, 2021).
- [80] Decreto-Lei n.º 145/2009. Diário da República n.º 115/2009, Série I 2009-06-17.
- [81] Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho. Diário Da República n.º 129/2004, Série I-B de 2004-06-02.
- [82] Portaria n.º 1429/2007. Diário da República n.º 211/2007, Série I de 2007-11-02.
- [83] Ordem dos Farmacêuticos, Norma Geral sobre Preparação Individualizada da Medicação. 2018.
- [84] Portaria n.º 1427/2007. Diário da República n.º 211/2007, Série I de 2007-11-02.

Anexos

Anexo 1- Panfleto informativo sobre a correta administração de insulina.

ADMINISTRAÇÃO DE INSULINA



FARMÁCIA
MUTUALISTACOVILHANENSE

TIPOS DE INSULINA

- Insulina “lenta” ou basal: administração 1 a 2 vezes por dia em jejum e/ou ao jantar/deitar; aparência translúcida ou leitosa;
- Insulina “rápida” ou prandial: administração ocorre antes das principais refeições; sempre aparência translúcida;
- Insulina “mistura” ou bifásica: mistura de insulina “lenta” e “rápida”; antes das refeições; aparência sempre leitosa.

TIPOS DE CANETA

- Pré-cheias: já carregadas com insulina; depois de utilizadas são deitadas fora (descartáveis);
- Recarregáveis: a caneta vem à parte; os cartuchos de insulina adquirem-se na farmácia, para colocar dentro da caneta.



Locais de Administração

- **ABDÔMEN:** Local de absorção mais rápido. Administração de insulinas rápidas (antes da refeição).
- **ANTEBRAÇO:** Evitar administrar insulinas rápidas se estiver a planejar fazer exercício físico com os braços (ex. estender a roupa).
- **COXA:** Alternativa prática e fácil antes de deitar, sobretudo para insulinas de ação lenta. Não utilizar se for fazer exercício físico (ex. caminhar).
- **NÁDEGA:** Alternativa ao abdômen. Absorção um pouco mais demorada.

Notas Importantes

- Independentemente do tipo de caneta que utilize, terá que **fixar uma agulha na ponta, aquando da administração.**
- Tenha em atenção que **cada caneta tem instruções específicas de utilização.** Leia atentamente essas instruções e consulte o prazo de validade.
- **NUNCA** deixe a agulha na caneta entre administrações.
- **NUNCA** reutilize as agulhas. Estas destinam-se a uma única administração.



Importante memorizar o nome e aparência da caneta e cartucho

Passos que deve seguir para um correta administração:

- 1** LAVE BEM AS MÃOS, COM ÁGUA E SABÃO.
- 2** FIXE A AGULHA NA CANETA E RETIRE A TAMPA PROTETORA.
- 3** TESTE A CANETA COM UM OU DOIS DISPAROS PARA O AR. SE NÃO SAIR LÍQUIDO, A CANETA PODERÁ NÃO ESTAR A FUNCIONAR CORRETAMENTE.
- 4** CONFIRME A DOSE E ASSEGURE-SE DE QUE VAI ADMINISTRAR O NÚMERO CORRETO DE UNIDADES DE INSULINA.
- 5** SELECIONE O LOCAL DE ADMINISTRAÇÃO, ALTERANDO ENTRE ABDÔMEN, COXAS, NÁDEGAS E ANTEBRAÇOS.
- 6** SE UTILIZAR AGULHAS MAIORES, DEVE FAZER UMA PREGA NA PELE; SE UTILIZAR UMA AGULHA MAIS PEQUENA, NÃO É NECESSÁRIO FAZER PREGA.
- 7** LIMPE A ZONA ONDE VAI ADMINISTRAR E FAÇA A INJEÇÃO COM A CANETA EM POSIÇÃO VERTICAL EM RELAÇÃO À PELE.
- 8** APÓS INJEÇÃO, CONTE ATÉ 5 ANTES DE REMOVER A AGULHA, PARA EVITAR PERDAS DE INSULINA.
- 9** DESCARTE A AGULHA PARA UM CONTEÚTOR APROPRIADO. FECHÉ O CONTEÚTOR.

