



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

**A oxidação de esteroides no desenvolvimento de
potenciais agentes antioxidantes e antitumorais**
**Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia
Comunitária, Hospitalar e Investigação**

Mafalda Tomás Labrusco de Apolónio Serralha

Relatório de Estágio para a obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
(Ciclo de Estudos Integrado)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre
Coorientador: Prof. Doutora Luiza Granadeiro

Covilhã, junho de 2012

Dedicatória

Em memória da minha avó Ermelinda e do meu avô Chico, as grandes motivações e inspirações deste meu trabalho.

Agradecimentos

A todos aqueles que por um motivo ou por outro, puseram pedras no meu caminho, possibilitando a subida, degrau a degrau, até este fantástico momento.

Ao Professor Doutor Samuel Silvestre, por toda a motivação, empenho, disponibilidade, imensa ajuda e por nunca me deixar desistir.

À Professora Doutora Luiza Granadeiro, pelo seu apoio durante quatro anos como Diretora de Curso e neste último ano como coorientadora deste projeto.

Ao Dr. Luís Martins, pela orientação durante o estágio em Farmácia Comunitária.

À Dra. Luísa Pereira e ao Dr. Nuno Landeira, pela orientação durante o estágio em Farmácia Hospitalar.

A toda a equipa da Farmácia Diana e dos Serviços Farmacêuticos do HESE, pela paciência, carinho e disponibilidade demonstrados. Às Dras. Filipa Tátá e Alice Rebelo por toda a disponibilidade e paciência.

À D. Lucinda, que nos momentos menos bons foi como uma segunda mãe.

Ao Vítor Gaspar, por toda a sua ajuda e disponibilidade.

Ao Márcio Geraldes e ao João Inácio e restantes colegas de Mestrado, pela ajuda e pelos bons momentos.

Às colegas do Endócrino, especialmente à Eduarda, à Catarina e à Inês, por todas as palhaçadas e risadas que ajudaram a ultrapassar os momentos mais difíceis e menos bons que existiram no laboratório.

A toda a minha família, por estarem sempre lá a apoiar e por terem orgulho de eu ser sua sobrinha/neta/prima.

E por último, por serem as mais importantes e as primeiras no meu coração, aquelas duas pessoas que há mais de trinta anos por sua autorrecriação em casamento se “ajuntaram” e sem as quais não existiria este pequeno geniozinho.

Mafalda Serralha

Prefácio

Ao chegar ao fim de cinco anos de curso, é com enorme prazer que compilo neste documento alguns dos conhecimentos apreendidos durante este percurso. Foram anos de muito esforço e suor que me tornaram numa pessoa diferente que espera poder contribuir para um mundo um pouco melhor quer com os resultados da minha investigação quer com a minha futura prática profissional.

“These mist covered mountains / Are a home now for me / But my home is the lowlands /And always will be”

Brothers in Arms - Dire Straits

Resumo

A principal responsabilidade do farmacêutico é para a saúde e o bem-estar do doente e do cidadão em geral, promovendo o direito a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança.

Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária, 2009

Como cada vez mais as Ciências Farmacêuticas são uma área mais abrangente, com uma ampla gama de saídas profissionais, decidi rentabilizar o estágio ao máximo, dividindo o meu tempo em três áreas distintas, adquirindo assim no decorrer destes estágios outros conhecimentos base, para além dos apreendidos durante a parte curricular do MCF.

Sendo assim, o presente relatório encontra-se dividido em três capítulos subsequentes, nos quais descrevo a minha experiência profissionalizante deste último ano letivo. O primeiro capítulo refere-se ao estágio em Farmácia Comunitária realizado na Farmácia Diana em Évora no qual se descreve o que observei e realizei durante o mesmo como, por exemplo, o funcionamento interno da farmácia, atendimento ao público e prestação de cuidados de saúde ao utente, indicação farmacêutica e educação para a saúde. O segundo capítulo refere-se ao estágio em Farmácia Hospitalar realizado no Hospital do Espírito Santo de Évora, EPE, no qual se descreve o que observei e realizei durante o mesmo como, por exemplo, preparação e controlo de produtos farmacêuticos, distribuição de medicamentos, dispensa de medicação sujeita a legislação em ambulatório e participação do farmacêutico nas visitas médicas. O terceiro capítulo refere-se ao estágio em Investigação realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior o qual tinha como objetivo a síntese de Δ^5 -esteroides oxidados em C7 e a sua avaliação como potenciais agentes antioxidantes e antiproliferativos em linhas celulares cancerígenas hormonodependentes (MCF-7 e LNCaP) e em fibroblastos normais da derme humana. A atividade antioxidante foi avaliada pelo ensaio do DPPH e a atividade antiproliferativa foi avaliada pelo ensaio do MTT. Os Δ^5 -esteroides e os seus 7-oxoderivados não mostraram capacidade elevada para neutralizar o radical livre DPPH, sendo que nenhum deles diminuiu a % DPPH remanescente para valores inferiores a 50%. Observou-se, contudo, que os Δ^5 -esteroides, neste ensaio, evidenciaram maior capacidade antioxidante que os seus 7-oxoderivados. Em relação aos ensaios de viabilidade celular (ensaio do MTT), os compostos que se mostraram mais tóxicos para as células foram a diosgenina e o seu derivado oxidado. Neste estudo verificou-se que os Δ^5 -esteroides têm maior ação antiproliferativa nos três tipos de células que os seus 7-oxoderivados.

Palavras-chave

Farmácia Comunitária, Farmácia Hospitalar, antioxidante, antitumoral, mama, próstata

Abstract

The primary responsibility of the pharmacist is the health and welfare of the patient and the citizen in general, promoting the right to be treated with quality, efficacy and safety.

Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária, 2009

As more and more Pharmaceutical Sciences is a broader area, with a wide range of career options, I decided to divide my practical training time into three distinct areas, acquiring additional knowledge, in addition to those learned during the course of MICF.

Therefore, this report is divided into three subsequent chapters, in which I describe my experience during this past year. The first chapter refers to the practical training held in the Community Pharmacy in Farmácia Diana in Évora, which describes what I observed and performed during the same as, for example, the usual work of the pharmacy, customer service and providing health care to user, pharmaceutical counseling and health education. The second chapter refers to the practical training in Hospital Pharmacy performed at Hospital do Espírito Santo Évora, EPE, which describes what I observed and performed during the same as, for example, preparation and control of pharmaceuticals, drug distribution, dispensing medication subject to legislation and participation of pharmacist outpatient medical visits. The third chapter refers to a research period performed at CICS-FCS in Universidade da Beira Interior, which aimed the synthesis of Δ^5 -steroids oxidized at C7 and their evaluation as potential antioxidant and anti-proliferative agents in hormone-dependent cancer (MCF-7 and LNCaP) cell lines and normal human dermal fibroblasts. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH assay and the antiproliferative activity was evaluated by the MTT assay.

The Δ^5 -steroid compounds and their 7-oxoderivatives did not show great capacity to neutralize the free radical DPPH, none of which reduced the % remaining for DPPH values lesser than 50%. In spite of this, it was observed that, in this assay, Δ^5 -steroids have better antioxidant properties than their 7-oxoderivatives. In cell viability assays, the most antiproliferative agents were diosgenin and 7-oxodiosgenin. In this study, it was also observed that Δ^5 -steroids have higher antiproliferative activity than their 7-oxoderivatives.

Keywords

Community Pharmacy, Hospital Pharmacy, antioxidant, antitumoral, breast, prostate

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Prefácio	vii
Resumo	ix
Palavras chave	x
Abstract	xi
Key words	xii
Índice	xv
Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Acrónimos	xxiii
1 Estágio em Farmácia Comunitária	1
1.1 Introdução	1
1.2 Instalações e equipamentos	1
1.3 Farmacêutico e pessoal de apoio	2
1.4 Medicamento e outros produtos de saúde	3
1.5 Cedência de medicamentos, Indicação farmacêutica e Educação para a Saúde	5
1.6 Manipulação de medicamentos	8
1.7 Seguimento farmacoterapêutico e Determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos	9
1.8 Uso racional do medicamento e Farmacovigilância	10
1.9 Administração de medicamentos	11
1.10 Avaliação da qualidade dos serviços farmacêuticos	11
1.11 Discussão e Conclusões	12
2 Estágio em Farmácia Hospitalar	15
2.1 Introdução	15
2.2 Gestão	16
2.2.1 Recursos Humanos	16
2.2.2 Funções	17
2.2.3 Recursos Económicos	18
2.2.3.1 Aprovisionamento	18
2.3 Preparação e controlo de produtos farmacêuticos	22
2.3.1 Pessoal	22
2.3.2 Instalações, equipamentos e materiais	22
2.3.3 Documentação	23
2.3.4 Métodos de Preparação	24

2.3.5 Controlo de Qualidade e validação	26
2.4 Distribuição de medicamentos	27
2.4.1 Distribuição Individual Diária em Dose Unitária	28
2.4.2 Distribuição Tradicional de medicamentos	28
2.4.2.1 Reposição por Níveis	28
2.4.2.2 Distribuição Personalizada	31
2.4.3 Circuitos Especiais de Distribuição	31
2.4.3.1 Distribuição de Medicamentos Estupefacientes	31
2.4.3.2 Distribuição de Hemoderivados e de Medicamentos Citotóxicos	32
2.4.3.3 Distribuição de Medicamentos em Ensaio Clínicos	34
2.4.4 Instalações e equipamentos	35
2.5 Ambulatório	35
2.5.1 Dispensa de medicamentos, Dispositivos médicos e outros produtos farmacêuticos, Receção e avaliação da prescrição e Registo e controlo da medicação dispensada	36
2.5.2 Medicamentos Legislados	37
2.5.3 Cuidado Farmacêutico ao Doente de Ambulatório, Informação ao Doente e Farmacovigilância	39
2.6 Centro de Informação de Medicamentos	40
2.6.1 Visita Médica	41
2.7 Discussão e Conclusões	41
3 Estágio em Investigação	43
3.1 Introdução	43
3.1.1 Radicais Livres, Neoplasias Malignas e Patologias do Sistema Nervoso	43
3.1.2 Esteroides	47
3.1.3 Importância biológica de Δ^5 -esteroides e seus derivados 7-oxidados	50
3.2 Objetivos	51
3.3 Parte Experimental	52
3.3.1 Materiais e Reagentes	52
3.3.2 Síntese química	53
3.3.2.1 Acetilação da diosgenina	54
3.3.2.2 Oxidação alílica do acetato de diosgenina	55
3.3.2.3 Hidrólise alcalina do acetato de diosgenina	55
3.3.2.4 Oxidação alílica do DHEA	56
3.3.2.5 Oxidação alílica do acetato de pregnenolona	57
3.3.2.6 Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxopregnenolona	58
3.3.2.7 Hidrólise alcalina do acetato de pregnenolona	59

3.3.3 Ensaio colorimétrico para determinação da capacidade antioxidante - Ensaio do DPPH	60
3.3.4 Ensaio em linhas celulares	62
3.3.4.1 Descrição das linhas celulares utilizadas nos ensaios e sua cultura	62
3.3.4.2 Tripsinização, contagem e sementeira das células	64
3.3.4.3. Avaliação da actividade proliferativa/antiproliferativa dos compostos em estudo - Ensaio do MTT	65
3.3.3.5 Análise estatística	66
3.4 Resultados obtidos e discussão	67
3.5 Conclusões e perspectivas futuras	78
4 Bibliografia	80
Anexos	86

Lista de Figuras

- Figura 1 Modelo exemplificativo das etiquetas autocolantes utilizadas nas embalagens durante a cedência de medicação.
- Figura 2 Organização hierárquica dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares do Hospital Espírito Santo
- Figura 3 Esquema da Unidade de Nutrição Parentérica (UNP)
- Figura 4 Modelo exemplificativo das etiquetas utilizadas nas embalagens durante a cedência de hemoderivados.
- Figura 5 Núcleo esteroide e respetiva numeração de carbonos
- Figura 6 Núcleos base das principais classes de esteróides existentes no organismo humano
- Figura 7 Biotransformação do colesterol em pregnenolona
- Figura 8 Oxidação alílica de Δ^5 esteroides
- Figura 9 Acetilação da diosgenina
- Figura 10 Oxidação alílica do acetato de diosgenina
- Figura 11 Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina
- Figura 12 Oxidação alílica da DHEA
- Figura 13 Oxidação alílica do acetato de pregnenolona
- Figura 14 Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxopregnenolona
- Figura 15 Hidrólise alcalina do acetato de pregnenolona
- Figura 16 Molécula de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)
- Figura 17 Células MCF-7
- Figura 18 Células LNCaP
- Figura 19 Representação de uma placa de 24 *wells* e de como foram distribuídas as concentrações, os controlos e os zeros.
- Figura 20 Molécula do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazólio] e respetiva clivagem pela enzima succinato desidrogenase
- Figura 21 Estudo cinético comparativo de todos os compostos na concentração de 5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Figura 22 Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas a cada um dos compostos em estudo em determinada concentração
- Figura 23 Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas à pregnenolona e à 7-oxopregnenolona nas diferentes concentrações
- Figura 24 Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição ao DHEA e ao 7-oxo-DHEA nas diferentes concentrações
- Figura 25 Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas à diosgenina e à 7-oxodiosgenina nas diferentes concentrações
- Figura 26 Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas a cada um dos compostos em estudo em determinada concentração

- Figura 27 Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas à pregnenolona e à 7-oxopregnenolona nas diferentes concentrações
- Figura 28 Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas ao DHEA e ao 7-oxo-DHEA nas diferentes concentrações
- Figura 29 Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas à diosgenina e à 7-oxodiosgenina nas diferentes concentrações
- Figura 30 Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas a cada um dos compostos em estudo em determinada concentração
- Figura 31 Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas à pregnenolona e à 7-oxopregnenolona nas diferentes concentrações
- Figura 32 Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas ao DHEA e ao 7-oxo-DHEA nas diferentes concentrações
- Figura 33 Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas à diosgenina e à 7-oxodiosgenina nas diferentes concentrações

Lista de Tabelas

- Tabela 1 Representação da periodicidade e tipo de reposição em cada serviço
- Tabela 2 Hemoderivados à base de imunoglobulinas específicas utilizados no HESE e suas indicações clínicas
- Tabela 3 Hemoderivados à base de proteínas da coagulação utilizados no HESE e suas indicações clínicas
- Tabela 4 Hemoderivados à base de proteínas da anticoagulação utilizados no HESE e suas indicações clínicas
- Tabela 5 Comparação de valores de DPPH remanescente para os diferentes compostos em estudo aos 30 e 330 min
- Tabela 6 Comparação da EC_{50} dos diferentes compostos em estudo aos 30 e 330 min
- Tabela 7 Valor de IC_{50} para cada um dos compostos estudados
- Tabela 8 Serviços existentes no HESE, EPE

Lista de Acrónimos

ACSS	Administração Central dos Sistemas de Saúde
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
ANF	Associação Nacional de Farmácias
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
AUE	Autorização de Utilização Especial
CFLH	Câmara de Fluxo Laminar Horizontal
CFT	Comissão de Farmácia e Terapêutica
CICS	Centro de Investigação em Ciências da Saúde
CIM	Centro de Informação de Medicamentos
DA	Doença de Alzheimer
DCM	Diclorometano
DIDDU	Distribuição Individual Diária em Dose Unitária
DHEA	Desidroepiandrosterona
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Doença de Parkinson
DPPH	α, α -difeníl- β -picrilhidrazil ou 2,2-difeníl-1-picrilhidrazil
EC ₅₀	Concentração Efetiva a 50%, i.e., concentração que reduz a atividade do DPPH em 50%
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EPE	Empresa Pública do Estado
Et ₂ O	Éter dietílico
FBS	Soro fetal bovino
FEFO	First Expired First Out
FHNM	Formulário Hospitalar Nacional do Medicamento
HESE	Hospital do Espírito Santo Évora
IC ₅₀	Concentração inibitória a 50%, i.e., concentração de composto que provoca uma redução da viabilidade celular em 50%
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP
INR	Rácio Internacional Normalizado
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i>
MBPFC	Manual de Boas Práticas para a Farmácia Comunitária
MBPFH	Manual de Boas Práticas para a Farmácia Hospitalar
MCDT	Meios Complementares de Diagnóstico e Terapêutica
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MeOH	Metanol

MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHDF	<i>Normal human dermal fibroblasts</i>
NMR	Ressonância Magnética Nuclear
PBS	Tampão fosfato salino
ppm	Partes por milhão
PSA	Antigénio específico da próstata
RAM	Reação Adversa Medicamentosa
RCM	Resumo das Características do Medicamento
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SFH	Serviços Farmacêuticos Hospitalares
SGCIM	Sistema de Gestão do Circuito Integrado do Medicamento
TBHP	Hidroperóxido de <i>terc</i> -butilo
TDT	Técnico de Diagnóstico e Terapêutica
TEA	Cloreto de tetraetilamónio
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Cromatografia em Camada Fina
UNP	Unidade de Nutrição Parentérica
UV	Ultravioleta

1 Estágio em Farmácia Comunitária

1.1 Introdução

A Farmácia Diana situa-se em Évora, no Largo das Portas de Moura. Foi fundada nos finais da década de 60 sendo o atual diretor técnico e proprietário o Dr. Luís Martins e conta com uma equipa constituída por um farmacêutico, duas técnicas de farmácia e duas ajudantes técnicas.

O estágio foi realizado entre o dia 1 de março de 2012 e o dia 13 de abril de 2012.

Como linha de orientação para esta parte do relatório, para ficar tudo ordenado e ter um seguimento lógico, decidi seguir a estrutura do Manual de Boas Práticas para a Farmácia Comunitária (MBPFC).

1.2 Instalações e equipamentos

A farmácia tem um ambiente calmo e está adequadamente iluminada nas zonas essenciais. As montras são elaboradas quinzenalmente de acordo com a estação do ano ou as “modas”; quando iniciei o estágio a montra estava feita com antiflatulentos, passados uns dias fez-se nova montra com xaropes expetorantes e na última semana fez-se com produtos materno-infantis.

Relativamente à limpeza e higiene da farmácia, esta é feita diariamente por uma empresa contratada para esse efeito. Os balcões de trabalho, os armários e as prateleiras são lisos, laváveis e em material adequado e resistente.

Toda a equipa veste as batas características das Farmácias Portuguesas e estão todos devidamente identificados pelo uso de um cartão que contém o nome e o título profissional.

Os serviços farmacêuticos prestados, juntamente com o preço respetivo, encontram-se expostos num placard grande à entrada da farmácia e também se encontram escritos de uma forma mais genérica no vidro da montra.

Na sala de espera existe um banco para os utentes e/ou acompanhantes. Estão também disponibilizados outros produtos de saúde, divididos por nove áreas de exposição no âmbito da lei em vigor: fitoterapia, puericultura, nutrição, medicação familiar, higiene oral, capilares, ortopedia, homem e dermocosmética.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Anexo ao local de cedência farmacêutica existe um gabinete check-saúde (livre o mais possível de ruídos) que não só é o local onde se realiza a prestação dos serviços farmacêuticos acima mencionados mas que também permite um diálogo em privado e confidencial com o doente.

No laboratório, anexo ao armazém, as superfícies de trabalho são lisas e em material adequado, com todo o material de laboratório e de medição de parâmetros essencial e em condições de utilização.

Em termos de segurança, existe um sistema de câmaras de vídeo-vigilância com gravação de imagem bem visível na zona de atendimento e que ao mesmo tempo serve para monitorizar a quantidade de utentes à espera para serem atendidos, dispensando o aviso ao público de que está a ser filmado.

Existe também um sistema de proteção que impede a intrusão e o furto; nas noites de serviço, a porta fecha ao público às 22 horas passando o atendimento a ser feito através de um postigo de atendimento.

O equipamento necessário à atividade da farmácia encontra-se em bom estado de funcionamento e está adaptado aos produtos preparados e dispensados na farmácia.

Todo o material de laboratório (incluindo o material de vidro), os formulários, as farmacopeias e a documentação oficial encontram-se de acordo com a legislação em vigor.

A farmácia encontra-se preparada para armazenar produtos de frio, existindo equipamentos que permitem a monitorização da temperatura e da humidade. Todo o equipamento é alvo de validação e manutenção periódicas.

O sistema informático respeita uma metodologia que permite evitar a perda de informação em caso de acidente ou avaria informática com uma rápida e fácil recuperação de dados.

1.3 Farmacêutico e pessoal de apoio

"A formação dos farmacêuticos, com Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, inclui cinco anos de percurso universitário, acrescidos de estágios curriculares que incidem no conhecimento científico e técnico sobre os medicamentos e na utilização destes, tendo como objetivo principal a defesa da saúde pública nas diversas áreas da sua atividade" (MBPFC).

Durante o estágio participei numa formação organizada pelos laboratórios edol sobre Aconselhamento Farmacêutico Diferenciado: a importância da higiene palpebral e a patologia do olho seco. Considerei importante ir a esta formação pois a nossa profissão está em constante evolução e o farmacêutico tem a obrigação de se manter informado e atualizado de modo a que preste sempre o melhor cuidado possível ao utente, tal como descrito no artigo 83º do Decreto-Lei 288/2001 de 10 de novembro.

Com o objetivo da formação contínua, é necessário que o farmacêutico tenha acesso a fontes de informação sobre medicamentos tais como: Prontuário Terapêutico, Resumo das Características do Medicamento (RCM), Martindale - The Extra Pharmacopeia, British National Formulary e Índice Nacional Terapêutico; os RCM, por a sua consulta ser mais morosa, apenas os consultava ao final do dia se tivesse ficado com alguma dúvida sobre um atendimento desse dia.

As competências da equipa que trabalha na farmácia encontram-se claramente definidas, de modo a assegurar a máxima qualidade dos serviços prestados, respeitando assim os princípios anunciados no código de ética. O diretor supervisiona e avalia as tarefas delegadas a cada membro da equipa.

Em relação às funções específicas dos farmacêuticos descritas no Decreto-Lei nº 288/2001 de 10 de novembro, o ponto "Cedência de medicamentos" é também realizada pelas técnicas de farmácia. Em relação ao Seguimento Farmacoterapêutico, não é realizado segundo o Método Dader mas quando os utentes vão à farmácia pedir ajuda em relação a alguma patologia, o diretor sugere medicação e tem a preocupação de lhes pedir que voltem uns dias depois para avaliar novamente a situação.

1.4 Medicamento e outros produtos de saúde

O diretor é quem define e documenta os procedimentos de avaliação e seleção de fornecedores, sendo o principal fornecedor a Codifar; outro é a Alliance - os fornecedores são escolhidos de acordo com as condições feitas à farmácia e de acordo com a sua qualidade e timing. Em relação aos produtos homeopáticos o fornecedor é a Farmácia Melo. A Farmácia Diana também é fornecedora do Hospital quando é necessária medicação que não conste do formulário do hospital. Quando se adquirem os produtos verifica-se se estes estão conforme com os requisitos de compra, de qualidade da farmácia e os requisitos legais.

Como esta farmácia está inserida numa rede de farmácias, todas pertencentes ao diretor, conseguimos por vezes uma circulação de medicamentos sem ser necessário recorrer aos fornecedores, por intercâmbio entre farmácias. Se o medicamento se encontrar na farmácia de S. Manços ou no posto de Monte Trigo, conseguimos obtê-lo no próprio dia por volta das 20

horas, quando a diretora técnica de S. Manços vem dar o fecho de dia. Se se encontrar numa das farmácias de Lisboa ou na farmácia de Ponte-Sor, pode vir através dos fornecedores na encomenda ou pelo Dr. Luís que trabalha em todas as farmácias durante uma semana. O controlo e inventário das compras são assegurados pelo registo das notas de encomenda, de entrada e saída para consumo, do registo de lotes e de validades. Neste ponto realizei o mapeamento das validades que terminavam em junho e em julho e o controlo de stocks errados. Os stocks máximo e mínimo são calculados de acordo com as ultimas vendas.

Existem procedimentos e critérios para a verificação, aceitação ou rejeição do produto; por exemplo, quando dei entrada de certa encomenda, devolvi ao fornecedor uma garrafa de hipoclorito de sódio pois o rótulo não se lia e estava meio destruído devido a algum derrame.

Ao dar entrada das encomendas tinha sempre o cuidado de verificar o fornecedor, as condições dos produtos que entravam e os prazos de validade, se fosse um produto cujo stock se encontrava a zero, alterava a validade para a validade do produto rececionado nesse momento.

O armazenamento respeita as condições de iluminação, temperatura, humidade e ventilação específicas. Na sala por detrás da zona de atendimento existe um sistema de gavetas onde se armazenam todas as embalagens de comprimidos, pomadas, colírios, gotas, supositórios, óvulos, xaropes e carteiras, tudo separado por forma farmacêutica. Na mesma sala, existe outro conjunto de gavetas, diferenciado do primeiro, onde se armazenam os medicamentos top, ou seja, os medicamentos mais vendidos pela farmácia: Aerius[®], Actifed[®], Aspirina GR[®], Lexotan[®] 1,5 mg, Tromalyt[®], Varfine[®], Xyzal[®]...

Em relação ao controlo e registo de psicotrópicos e estupefacientes, existem normas especiais. Se se tratar das receitas amarelas manuais, uma das cópias fica guardada num dossiê específico na farmácia, o original é enviado para a Finifarma para faturação e a outra cópia é enviada para o Infarmed. Se se tratar de receitas eletrónicas, a receita é enviada à Finifarma para faturação e fica uma cópia guardada num dossiê específico na farmácia. No final de cada mês são impressas três listagens: uma de entrada, uma de saída e uma de balanço de entradas / saídas. As listagens depois de conferidas são enviadas juntamente com o original das receitas manuais; se nesse mês não existirem receitas manuais, as listagens são enviadas sozinhas. Este envio e arquivo está ao abrigo do Decreto-Lei 15/93 de 22 de janeiro, retificado a 20 de fevereiro. Quem se encontra responsável por esta função é a Técnica de Farmácia mais graduada.

Na preparação da medicação em dose unitária, garante-se a conservação dos medicamentos para que se preserve a qualidade, a integridade, a eficácia e a segurança dos mesmos. Preparei papéis de um antibiótico para um cavalo, pois necessitava de quantidades pequenas de cada vez e o frasco tinha uma quantidade razoável. Eram necessários 30 papéis para 15 dias mas só se prepararam 15 de cada vez para se garantir a conservação dos mesmos.

Os medicamentos preparados e os medicamentos vindos dos laboratórios são rastreados através dos lotes.

1.5 Cedência de medicamentos, Indicação Farmacêutica e Educação para a Saúde

“A cedência de medicamentos é o ato profissional em que o farmacêutico, após avaliação da medicação, cede medicamentos ou substâncias medicamentosas aos doentes mediante prescrição médica ou em regime de automedicação ou indicação farmacêutica, acompanhada de toda a informação indispensável para o correto uso dos medicamentos” (MBPFC).

Quando nos entregam uma prescrição, a primeira coisa a fazer é identificar o doente, o médico e o organismo a que vai ser faturada, verificar a autenticidade e validade da mesma. Seguidamente interpreta-se o tipo de tratamento que o utente vai fazer, identificando o(s) medicamento(s) e a forma farmacêutica, posologia, apresentação, via de administração e duração da terapêutica. Quando a prescrição não pode ser dispensada no momento, telefona-se aos fornecedores a tentar ter a medicação ainda para esse dia ou para o dia seguinte; se não for possível e se for uma medicação muito urgente, procede-se como referido no ponto 1.3. Em relação a este assunto, ainda tive uns contratemplos, pois há muitos medicamentos esgotados no mercado, chegando o tempo de entrega a ser de três semanas.

Em relação à interpretação da prescrição, vi os colegas fazerem, assim como também me ajudaram com algumas; com certa prescrição tive necessidade de contactar com o prescritor, pois, este só tinha dito à utente como realizar a medicação nesse dia e não nos outros e, havendo mais do que um esquema posológico, resolvi telefonar para poder informar corretamente a utente como deveria proceder. Por vezes, neste âmbito, foi também necessário recorrer ao Índice Terapêutico ou a outra fonte de informação sobre medicamentos.

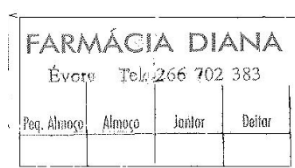
Nesta interpretação devemos verificar a adequação do medicamento prescrito ao doente (contraindicações, alergias, interações, intolerâncias), a adequação da posologia (dose, frequência, duração do tratamento) e se o doente consegue administrar o medicamento; se existir algum problema relacionado com o medicamento (PRM), pode ser necessário contactar o médico prescritor.

A todos os utentes que tenham ficha na farmácia é possível efetuar um registo da sua medicação mediante inscrição no programa informático, sendo estes dados confidenciais.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Quando se cede qualquer medicação, é necessário verificar o estado da embalagem e o prazo de validade do medicamento bem como assegurar as suas condições de estabilidade, garantindo sempre a qualidade do mesmo.

Toda a informação que consideremos necessária - modo e frequência de administração, contraindicações, interações e efeitos secundários - deve ser veiculada ao utente na altura da cedência. Esta deve adequar-se ao nível de instrução do mesmo; este procedimento pode ser reforçado com informação escrita, escrevendo a posologia nas embalagens ou em etiquetas autocolantes existentes para o efeito. A maioria dos utentes idosos e os menos instruídos pedia que se escrevesse a patologia em cada embalagem correspondente.



FARMÁCIA DIANA			
Évora		Telo 266 702 383	
Peq. Almoço	Almoço	Jantar	Deitar

Figura 1 - Modelo exemplificativo das etiquetas autocolantes utilizadas nas embalagens durante a cedência de medicação.

No final do atendimento faz-se uma pequena revisão sobre toda a terapêutica e assegura-se que o utente não tem dúvidas nem em relação à forma de ser tomada nem à sua duração.

“A automedicação é a instauração de um tratamento medicamentoso por iniciativa própria do doente” (MBPFC). Nestes casos é necessário avaliar corretamente o problema de saúde: sintomas, há quanto tempo persistem e se já foram tomados medicamentos; há que distinguir entre patologias que necessitam de referenciação médica e patologias que possam ser tratadas em automedicação. Neste caso são cedidos medicamentos não sujeitos a receita médica ou tratamentos não farmacológicos.

A cedência de medicamentos manipulados cinge-se a medicamentos prescritos ou formulações como vaselina salicilada. São também cedidos medicamentos manipulados como solução de hidrato de cloral ou solução de ácido acético a 3% a uma clínica de diagnóstico em Évora mediante pedido.

Em relação à “Oferta de outros Serviços”, prestei outros serviços, tais como participação no programa da ANF “Diz não a uma seringa em segunda mão” entregando e recebendo os kits para a prevenção da transmissão da SIDA; realização de pensos de primeiros socorros; explicação do funcionamento de um aparelho para medição de glicémia, medição da tensão

arterial na máquina automática existente na entrada da farmácia e medição no esfigomanómetro automático, realização de testes de gravidez.

"a indicação farmacêutica é o ato profissional pelo qual o farmacêutico se responsabiliza pela seleção de um medicamento não sujeito a receita médica e/ou indicação de medidas não farmacológicas, com o objetivo de aliviar ou resolver um problema de saúde considerado como um transtorno menor ou sintoma menor, entendido como problema de saúde de caráter não grave, autolimitante, de curta duração, que não apresente relação com manifestações clínicas de outros problemas de saúde do doente." (MBPFC)

Durante o estágio apareciam bastantes pessoas na farmácia queixando-se de dores de garganta, dores no corpo, febre e problemas respiratórios relacionados com a temperatura atmosférica, sendo necessário prestar um cuidado maior na forma de indicação farmacêutica. Após se estabelecer uma comunicação adequada com o doente, tenta-se perceber quais os sintomas que o estão a preocupar, a sua gravidade e duração; avalia-se também a possível existência de outros sintomas relacionados ou não com os primeiros. Ao avaliar estas situações, inquiria também o utente se sofria de outros problemas de saúde - problemas de estômago, por exemplo - de maneira a tentar orientar melhor a terapêutica. Todas as situações que envolviam a possível toma de um antibiótico, referenciava o utente para uma consulta médica, devido à problemática de resistência bacteriana que se está a criar em relação aos antibióticos; na consulta médica existem meios de diagnóstico melhores e mais corretos para se verificar se a situação é passível de tratamento com antibióticos de modo a prevenir a utilização desnecessária dos mesmos.

Em relação aos medicamentos cedidos em indicação farmacêutica, é necessário adequar a forma farmacêutica, a dose, a frequência de administração e a duração do tratamento à situação fisiológica do utente, a qualquer alergia medicamentosa que este possua, problemas de saúde diagnosticados e medicamentos que tome atualmente. Para isto, foi sempre necessário ter presente normas de indicação terapêutica, quer lembrando o que foi lecionado durante o MICF, voltando a estudar em casa ou se tivesse um pouco mais de tempo, consultando estas mesmas normas na farmácia. De ressaltar a enorme importância das guidelines de referência médica estudadas na unidade curricular de Prevenção e Terapêutica como por exemplo a da febre ou a da dor.

Em determinadas situações foi necessário indicar medidas não farmacológicas que ajudassem a resolver o problema apresentado pelo utente, como, por exemplo, repouso do pé no caso de um dedo mínimo partido.

Por enquanto, a intervenção farmacêutica não fica registada.

“A educação para a saúde é um processo ativo, que pretende criar na população, conhecimentos, habilidades e atitudes para saber prevenir e lidar com a doença, oferecendo-lhe a possibilidade de participar na tomada de decisões acerca da sua saúde. A educação para a saúde visa mudar os comportamentos individuais de risco e deste modo, melhorar a saúde das pessoas.” (MBPFC)

No âmbito da educação para a saúde, onde mais intervim foi junto de doentes com patologias cardiovasculares e diabetes e junto de muitas jovens que vinham comprar a pílula anticoncepcional e a pílula do dia seguinte. Aos primeiros era muitas vezes necessário apelar à menor ingestão de sal, de gorduras e de açúcar; tentar que, especialmente nos doentes diabéticos, substituíssem um pouco da batata e dos farináceos por mais vegetais e verduras; apelar que, pelo menos uma vez por semana, medissem a sua tensão arterial. Às segundas era necessário explicar os efeitos que a pílula poderia ter, que existem diferentes composições de pílulas e o risco acrescido de fumar ao mesmo tempo que tomam a pílula. Em relação à pílula do dia seguinte, para além disto tinha ainda de explicar que não é um método cem por cento seguro, que não impede a fecundação, se esta já tiver ocorrido, apenas impedindo a aderência do ovo à parede do útero; que é natural que ocorram náuseas e que se vomitar até duas horas após a toma é necessário tomar outra. Apareceram na farmácia uma ou duas raparigas a perguntar se como se tinham esquecido / não tinham a pílula em casa no dia em que era suposto começarem a tomar se podiam começar nesse dia que foram à farmácia, cheias de dúvidas. Era então necessário explicar que, apesar da diferença de dias não ser muita - um a dois dias em relação ao dia suposto - nesse mês teriam de ter mais cuidado e se fossem sexualmente ativas teriam de utilizar também outro método anticoncepcional.

1.6 Manipulação de medicamentos

O laboratório tem o material mínimo necessário para a preparação de medicamentos manipulados tendo em conta a sua natureza e dimensão dos lotes preparados. Está convenientemente iluminado e ventilado e com temperatura e humidade adequadas para a realização das operações de preparação, acondicionamento, rotulagem e controlo.

Todos os registos das preparações feitas, das substâncias utilizadas e respetivo lote, do número de lote do manipulado, do modo de preparação, do controlo de qualidade, das condições de conservação e dos prazos de utilização e do cálculo do preço de venda são arquivados num dossiê próprio. Todos os registos de movimentos de matérias-primas utilizadas na preparação, bem como o seu boletim de análise são arquivados noutra parte.

Os medicamentos manipulados são identificados com um número de lote constante no registo e no rótulo que lhes permite uma rastreabilidade. O rótulo encontra-se de acordo com a legislação em vigor e é preenchido na altura em que se prepara o manipulado, com a identificação da farmácia, identificação do manipulado, via de administração, prazo de validade, condições especiais de conservação, data de preparação, e assinatura do farmacêutico.

Os procedimentos documentados para a preparação de medicamentos manipulados são os constantes do Formulário Galénico Português, que se fotocopia cada vez que é necessário preparar um manipulado. As preparações extemporâneas e os manipulados preparados na farmácia são feitos de acordo com prescrição médica ou de acordo com o Formulário Galénico Português. Todo o detalhe do procedimento é feito de acordo com o MBPFC.

Em termos de controlo de qualidade, as verificações que são feitas dependem da natureza do manipulado e das exigências de verificação da qualidade constantes da ficha de preparação do manipulado e devem incluir no mínimo a verificação das características organoléticas, sendo que o produto acabado satisfaça os requisitos da Farmacopeia Portuguesa.

No final do acondicionamento, é feita uma pesagem ou medido o volume para conferir se a massa / o volume final corresponde ao prescrito, sendo este resultado registado na ficha de preparação.

1.7 Seguimento farmacoterapêutico e Determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos

“O seguimento farmacoterapêutico é a prática profissional em que o Farmacêutico Comunitário Especialista se responsabiliza pelas necessidades do doente relacionadas com os medicamentos. Esta prática realiza-se mediante a deteção de Problemas Relacionados com Medicamentos para a prevenção e resolução de Resultados Negativos associados à Medicação” (MBPFC).

Em relação ao Seguimento Farmacoterapêutico, não observei que fosse muito praticado como anteriormente se disse.

Onde existe algum acompanhamento é na determinação de parâmetros bioquímicos e antropométricos onde os valores são registados num cartão e no dia em que o doente vem fazer novas medições são revistos todos os valores e conforme estes são dados alguns conselhos.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

“A determinação de parâmetros bioquímicos e fisiológicos em farmácia comunitária é uma atividade a exercer exclusivamente por farmacêuticos habilitados” (MBPFC). A determinação destes parâmetros é realizada no gabinete check-saúde referido no ponto 1.1 e é apenas feita pelo diretor e pelo outro farmacêutico.

Os parâmetros determinados são a tensão arterial (máxima e mínima, cujos valores ótimos são 120 mmHg e 80 mmHg respetivamente), a pulsação, o colesterol (cujo valor máximo recomendável é de 200 mg/dL), os triglicéridos (cujo valor máximo recomendado é de 150 mg/dL), a glicemia em jejum (cujo valor ótimo é de 100 mg/dL), o ácido úrico (que deve oscilar entre 3,5 mg/dL e 7,5 mg/dL), a creatinina (cujo valor deve oscilar entre 0,7 mg/dL e 1,2 mg/dL), a hemoglobina (que deve oscilar entre 12 g/dL e 15 g/dL nas mulheres e 14 g/dL e 17 g/dL nos homens), a GTP (que se deve encontrar abaixo de 40), o INR (que deve oscilar entre 0,8 e 1,2) e o PSA (cujo valor normal é de 4 ng/mL).

De todos estes parâmetros só determinei a tensão arterial, a pulsação, o colesterol, os triglicéridos e a glicemia em jejum, sendo que nestes últimos três fui sempre supervisionada.

Os aparelhos utilizados estavam devidamente validados e calibrados, tendo assistido também à sua limpeza.

1.8 Uso racional do medicamento e Farmacovigilância

Em termos de farmacovigilância, durante o estágio ocorreu o episódio da bebé de seis meses que morreu e que se suspeitava ter sido da administração das vacinas RotaTeq[®] e Prevenar3[®]; na véspera da notícia recebemos um fax para suspender a venda das vacinas desse lote em específico. Na farmácia existiam duas vacinas que foram imediatamente postas de parte com um aviso a dizer que pertenciam ao lote suspeito.

Quase todos os dias chegavam faxes por parte do INFARMED a pedir que fossem retirados e que não se vendessem determinados medicamentos, como a pomada Scheriproct[®] e os comprimidos Diclofenac[®] do laboratório Labesfal.

Felizmente, durante o período de estágio não foi necessário notificar nenhuma Reação Adversa a Medicamentos (RAM).

1.9 Administração de medicamentos

A única administração de medicamentos que se realiza na farmácia é a administração de vacinas que é feita pelo diretor por ser o único que tem formação para isso.

As vacinas administradas são registadas num boletim onde se anota o nome do utente, a idade, o contacto e relativamente à vacina o lote, a validade, o nome comercial e a forma de administração.

Apesar da formação obtida no último ano do MICF sobre administração de vacinas, durante o estágio não administrei nenhuma, tendo apenas observado a sua administração pelo diretor.

1.10 Avaliação da qualidade dos serviços farmacêuticos

"A qualidade dos serviços farmacêuticos deverá ser demonstrada através da acreditação pela Ordem dos Farmacêuticos em relação ao referencial das Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária" (MBPFC).

O Dr. Luís assume a qualidade dos serviços farmacêuticos de forma a que esta seja orientada para a satisfação das necessidades dos utentes, sendo objetivo alcançar a satisfação dos seus utentes em todas as suas atividades. Como tal, é responsável pela análise das possíveis reclamações por parte dos utentes da farmácia, das saídas de medições de satisfação dos utentes e das não conformidades identificadas no decorrer da atividade normal da farmácia.

Existe uma gestão dos equipamentos, um controlo das instalações das condições ambientais e da segurança e uma gestão do sistema informático, das compras e dos fornecedores, sendo efetuados todos os registos que são posteriormente arquivados.

Devido à falta de tempo e ao modo como se encontra o setor nesta altura, não se realizam auditorias internas na Farmácia Diana.

Assisti a uma inspeção da ASAE, tendo como objetivo a verificação da existência para comercialização de alguns medicamentos mandados retirar do mercado. Dentro do aspeto do controlo de qualidade da farmácia, pude verificar que a inspeção da ASAE ocorrida não detetou a comercialização dos mesmos, o que veio a testar a preocupação em cumprir as normas estabelecidas.

1.11 Discussão e Conclusões

Durante este estágio tenho observado bastante a venda de medicamentos que atuam no sistema nervoso, em especial benzodiazepinas e antidepressivos, havendo um claro aumento desde o estágio observacional efetuado no segundo ano do MICF. Esta tendência pode ser justificada pela crise económica que o país atravessa. A atual conjuntura económica sente-se bastante na movimentação da farmácia; as pessoas só compram o que lhes é essencial.

As alturas de maior movimentação são do dia 10 ao dia 15 e do dia 25 ao dia 30 de cada mês. As alturas do dia mais movimentadas são ao final da tarde a partir das 18 horas até por volta das 20 horas, hora de fecho da farmácia.

Existe um claro aumento de pedido de medicamentos genéricos por parte de pessoas que trazem consigo uma receita médica; por outro lado, temos aqueles utentes incrédulos com os genéricos que por mais que se tente explicar que o princípio ativo é o mesmo do que o do medicamento de marca e mostrando o nome em ambas as caixas, não querem de maneira nenhuma levar o genérico. Em relação aos primeiros, temos um sub-tipo de utentes que, apesar de a receita médica não estar trancada, insistem em levar aquele medicamento genérico de certo laboratório, dizendo até a cor da caixa dos que já lá têm em casa. Os utentes mais idosos encaixam quase todos neste último perfil.

Os medicamentos que mais se vendem são aqueles relacionados com patologias cardiovasculares, respiratórias e neurológicas: inibidores da enzima conversora de angiotensina, estatinas, broncodilatadores, benzodiazepinas, inibidores seletivos da recaptação da serotonina, etc.

Contactei com diversos tipos de utentes. Temos utentes regulares, que vivem perto da farmácia e que quase todos os dias lá vão nem que seja para cumprimentar; normalmente são utentes mais idosos, que conhecem um dos membros da equipa há mais de trinta anos. Temos também muitos utentes que, como a farmácia se situa perto do hospital, vêm ali diretamente após a consulta de urgência. Muitos procuram a ajuda dos farmacêuticos para alguma patologia que tenham e não queiram deslocar-se ao médico, outros procuram ajuda para saber para que é que determinado medicamento que estão a tomar, ou que vão iniciar terapêutica, serve. Outros há que não aceitam a explicação que queremos oferecer sobre a medicação e chegam mesmo a ficar ofendidos. O utente-tipo da farmácia é do sexo feminino, idoso, reformado e com múltiplas patologias, ilustrando bem a população portuguesa, que se encontra bastante envelhecida.

Surpreendeu-me bastante quão mal informadas ainda se encontram as jovens em relação à pílula anticoncepcional e à pílula do dia seguinte apesar de já existir bastante informação sobre o assunto; geralmente a maior preocupação é se determinado medicamento “corta” o efeito da pílula, não sabendo quase nada sobre efeitos adversos.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Uma das minhas maiores dificuldades neste estágio foi deparar-me com tanta marca comercial para os princípios ativos. Só quase no final do estágio consegui assimilar os nomes de muitas marcas e relacioná-las com os princípios ativos.

2 Estágio em Farmácia Hospitalar

2.1 Introdução

"... seo filho D. João II, a cuja perspicácia, e providencia do bem dos vassallos, nem se escondião os apices: alcançou do Papa licença para unir em hum só Hospital as rendas de todos os doze, e porque não teve tempo para fazer o Hospital, o fez seo successor D. Manoel com muyta magnificencia em 1495, escolhendo para elle o sitio do Spirito Santo por ser mais espaçozo, e sobre o muro da cidade..."

O Hospital do Espírito Santo (HESE) situa-se na cidade de Évora, cidade sede de concelho e capital de distrito, e, sendo classificado como Hospital Central - formalizado pela Portaria número 117/2008 de 6 de fevereiro -, tem também como área de influência indireta os concelhos do Alto e do Baixo Alentejo num conjunto total de 535753 habitantes (Relatório e Contas do HESE, 2010). Existem vários serviços e unidades funcionais no HESE (ver anexo); muitos deles são únicos na região: o Serviço de Nefrologia (dá resposta a 500 000 habitantes; tem destaque a nível nacional devido à experiência em diálise peritoneal), o Serviço de Cardiologia (tem uma Unidade de Cuidados Intensivos Cardíacos e uma Unidade de Angiografia Digital e Cardiologia de Intervenção) e o Serviço de Anatomia Patológica (serve todos os hospitais da área e os cuidados de saúde primários); assim como algumas especialidades cirúrgicas (Cirurgia Plástica, Cirurgia Pediátrica, Cirurgia Bariátrica, Cirurgia Maxilo-Facial e Cirurgia da Coluna).

O Serviço de Radioterapia encontra-se disponível desde setembro de 2009 resultante de uma parceria público-privada com o consórcio Lenicare.

O HESE está funcionalmente organizado em três áreas distintas: serviços de ação médica, serviços complementares de diagnóstico e terapêutica e serviços de apoio onde se enquadram os Serviços Farmacêuticos Hospitalares (SFH).

A atual área útil da farmácia é de 382 m² - correspondentes a 1,15 m² por cama - sendo que os rácios ideais apontam para 1,2 m² por cama (Manual da Qualidade do HESE).

O estágio foi realizado entre o dia 23 de abril e o dia 13 de junho de 2012.

Como linha de orientação desta parte do relatório, para ficar tudo ordenado e ter um seguimento lógico, decidi seguir a estrutura do Manual de Boas Práticas para a Farmácia Hospitalar (MBPFH).

2.2 Gestão

Os Serviços Farmacêuticos Hospitalares - atualmente instalados num novo espaço - estão organizados de acordo com os princípios e normas técnico-científicas das Ciências Farmacêuticas e por princípios de economia, tentando equilibrar os melhores resultados de custo-eficácia na utilização de medicamentos e a satisfação dos seus utentes.

Funcionam de 2^a a 6^a feira das 9 às 18 horas, ficando assegurado o serviço de prevenção nos dias úteis das 19 às 24 horas e aos Sábados, Domingos e feriados das 9 às 24 horas.

Nos SFH estão diferenciadas as seguintes áreas: Área de Receção e apoio administrativo, Área de Atendimento aos Serviços internos da Instituição, Área de Reembalagem de medicamentos, Área de Distribuição em Dose Diária Unitária, Área de Distribuição Tradicional, Área de Atendimento em Ambulatório, Área de Gestão / Direção de Serviço, Área de Informação de medicamentos e Área de Produção.

2.2.1 Recursos Humanos

«Os Serviços Farmacêuticos Hospitalares têm por objeto o conjunto de atividades farmacêuticas, exercidas em organismos hospitalares ou serviços a eles ligados, que são designadas por “atividades de Farmácia Hospitalar”» (MBPFH). Assim sendo, os Serviços Farmacêuticos Hospitalares têm como responsabilidades a gestão do medicamento e de outros produtos farmacêuticos, dos medicamentos experimentais e dos dispositivos utilizados para a sua administração; são responsáveis pela segunda maior rubrica orçamental dos hospitais sendo também os principais responsáveis pela implementação e monitorização da política de medicamentos definida no Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos (FHNM) e pela Comissão de Farmácia e Terapêutica (CFT).

Para garantir estas premissas, têm de possuir meios humanos adequados em número e em qualidade, meios estes que não estão afetos a uma única atividade, como se irá abordar posteriormente. Assim, a equipa é constituída por 20 elementos: sete farmacêuticos (sendo um a Diretora dos SFH), seis técnicas de Diagnóstico e Terapêutica - TDT - (sendo uma a técnica coordenadora), um assistente técnico e seis assistentes operacionais estando três afetos à distribuição, dois à reembalagem e um à reposição.

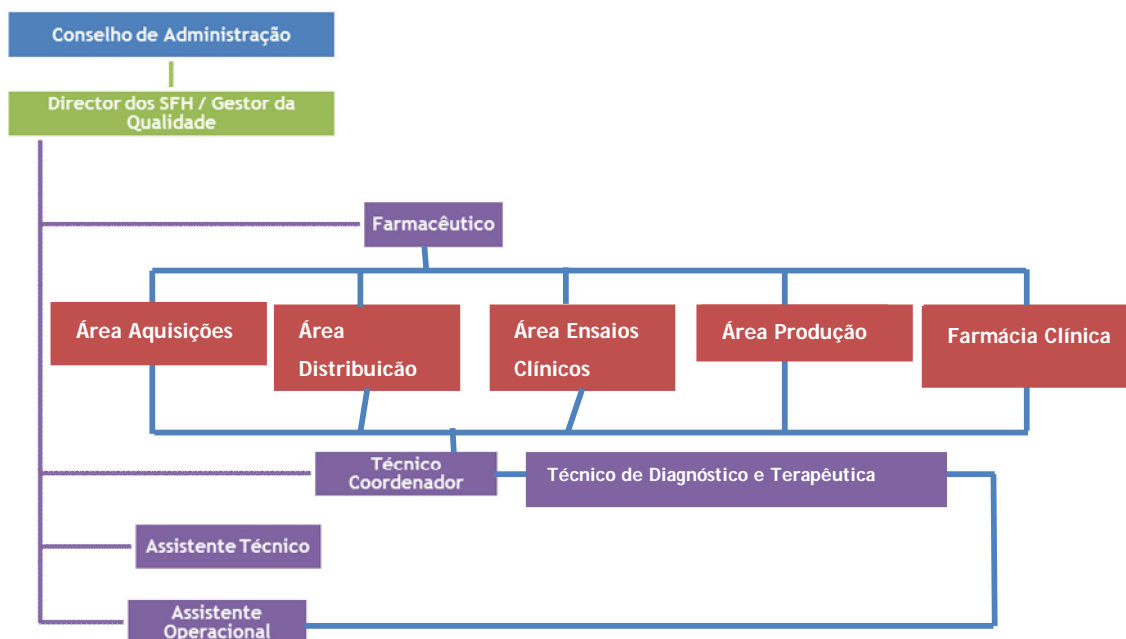


Figura 2 - Organização hierárquica dos Serviços Farmacêuticos Hospitalares do Hospital Espírito Santo

2.2.2 Funções

No ponto “Distribuição de funções”, a cada farmacêutico estão atribuídos determinados serviços do hospital sob o ponto de vista de responsabilidade mais direta, para fazer o seu acompanhamento e validar a distribuição de medicamentos a estes. Por exemplo, existe uma farmacêutica responsável pelas Especialidades Médicas, pela Convalescência, pelos Estupefacientes e pelos Ensaios Clínicos.

Para além das funções de Direção relacionadas com a Gestão do Serviço, a Dra. Luísa acumula ainda as funções do farmacêutico do setor de aquisições.

Em relação ao setor Farmacotecnia, estão duas farmacêuticas responsáveis que têm todas as funções descritas no MBPFH. As preparações não estéreis são efetuadas por uma TDT sob a supervisão da farmacêutica. No HESE não se efetuam preparações estéreis, apenas são efetuadas preparações em condições de assepsia.

Em relação à área da Oncologia, o serviço de Quimioterapia e o respetivo Hospital de Dia tem acompanhamento clínico por dois farmacêuticos responsáveis pois os citotóxicos ainda são preparados pela equipa de enfermagem. Felizmente, os SFH já estão a implementar a transferência da preparação dos citotóxicos para estes mesmos serviços, fazendo parte do mapa de objetivos para este ano civil.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Em relação à nutrição parentérica, existem três farmacêuticos nesta área, com rotação semanal que cumprem todas as funções constantes do MBPFH.

Não existe um farmacêutico único responsável pelo setor de informação, visto que todos contribuem um pouco, como se abordará na subsecção 2.6.

Não existe farmacêutico responsável pelo setor de farmacocinética visto este não existir nos SFH.

A farmacêutica responsável pelo setor da qualidade é a Diretora, que desempenha todas as funções constantes do MBPFH, tendo implementado o Manual da Qualidade em 2010.

2.2.3 Recursos Económicos

2.2.3.1 Aprovisionamento

Diariamente são recebidas a Lista de Faltas, solicitações de um serviço prescritor/prescrição (em papel ou eletrónicas); nos dias de pedidos são feitos mapas de pontos de encomenda no Sistema de Gestão do Circuito Integrado do Medicamento (SGCIM) sendo estes três itens analisados pela diretora. Se forem medicamentos que constem do formulário hospitalar, basta verificar o valor do stock no armazém central dos SFH, para quando está definido o ponto de encomenda no SGCIM, ver as características de consumo e ocasionalmente recalcular índices de gestão. Se forem medicamentos que não constem do formulário tem de se verificar se o medicamento está autorizado, se existe Código Hospitalar Nacional do Medicamento já aberto no sistema, se existe stock no armazém central dos SFH, o seu ponto de encomenda e as suas características de consumo. Após essa análise é concretizado o pedido de compra.

Por cada pedido, deve identificar-se o tipo do mesmo (normal ou urgente), o local de entrega, o medicamento a encomendar e a sua quantidade; quando se adquirem medicamentos de grande volume e/ou em grandes quantidades faz-se um pedido com entrega faseada e programada.

O pedido de compra baseado no mapa de pontos de encomenda é bissemanal e faz-se às segundas e quintas-feiras, excetuando pedidos urgentes que são feitos diariamente sempre que se justifique.

Durante o estágio tive a oportunidade de concretizar pedidos de compra supervisionada pelo responsável.

Como entidade EPE, o HESE está obrigado a comprar os produtos farmacêuticos pelo catálogo da Administração Central dos Sistemas de Saúde (ACSS); se o montante da encomenda for muito elevado, podem ser abertos concursos públicos mesmo que os produtos se encontrem no catálogo da ACSS.

Quando se abre um concurso público é necessário fazer um caderno de encargos que atualmente é colocado em plataforma eletrónica. *“O caderno de encargos é a peça do procedimento que contém as cláusulas a incluir no contrato a celebrar”* (artigo 42º do Decreto Lei 18/2008 de 18 de janeiro - código dos contratos públicos). Ainda tive contato com um caderno de encargos mais antigo impresso em papel. Neste momento, o preço é o fator com maior peso na decisão.

No caso de medicamentos que não estão introduzidos no mercado nacional é necessário um requerimento prévio de Autorização de Utilização Especial (AUE) ao INFARMED em impresso de uso obrigatório. O pedido é submetido ao INFARMED após autorização do Conselho de Administração com uma proposta fundamentada do Diretor de Serviço e o parecer positivo da CFT. Os documentos exigidos ficam arquivados no processo de AUE não necessitando de ser enviados ao INFARMED sendo enviado apenas o impresso de AUE, a declaração de substituição e a justificação clínica em impresso próprio no caso dos medicamentos extra formulário.

Durante o estágio organizei e arqueei os pedidos de AUE para o ano de 2012 e baseando-me nesse trabalho construí um conjunto de formulários tipo dos medicamentos mais pedidos em AUE com a finalidade de agilizar o processo para os anos vindouros.

No pedido de AUE, para medicamentos que não estejam no formulário, é necessário justificação clínica onde se referem as indicações terapêuticas e posologias, as estratégias para a situação clínica em causa, as terapêuticas alternativas e a sua inadequação à situação, a fundamentação científica da utilização do fármaco, tudo devidamente assinado pelo diretor do serviço requisitante.

Quando são medicamentos de benefício clínico bem reconhecido é necessário identificar o hospital e o serviço clínico utilizador, identificar o medicamento, a dose, a forma farmacêutica, a apresentação, a quantidade pretendida, a cadeia de medicamento: titular de AIM e país de registo, fabricante e país de fabrico, libertador de lote e país, distribuidor do país e procedência, distribuidor em Portugal (se aplicável), alfândega (se aplicável), a indicação do preço unitário e a estimativa da despesa total, com IVA incluído, cópia da AIM e do RCM. Se forem medicamentos com provas preliminares de benefício clínico é necessário acrescentar à justificação clínica justificação da impossibilidade da inclusão em ensaio clínico, a quantidade de medicação a utilizar, incluindo dose diária e duração prevista para o tratamento e o número e identificação dos doentes a tratar, a declaração de Ambiente de segurança feita pelo médico utilizador, declaração de consentimento informado do doente (quando adquirido ao abrigo de AIM em país estrangeiro) e cópia dos resultados das provas experimentais.

No final do ano é feito pelo farmacêutico responsável pelas aquisições o inventário de todos os medicamentos de AUE de utilização mais comum no hospital, de modo a avaliar as

existências, controlar as validades e analisar os consumos, pois os medicamentos de AUE não podem ser devolvidos; deve prever quais as necessidades no sentido de desencadear novos pedidos de AUE para o ano seguinte.

O hospital pode requerer alteração da quantidade inicialmente pedida durante o período de vigência da AUE desde que envie o impresso de declaração obrigatória com os mesmos dados enviados anteriormente e que preencha também o campo "Pedido de Alteração da Quantidade" fazendo referência ao número da autorização concedida e fundamentando a alteração.

As encomendas são entregues diariamente nos SFH entre as 9 e as 18 horas - num cais acostável com plataforma elevatória e acesso direto ao exterior -, exceto gases medicinais que são rececionados num armazém separado fisicamente. A aceitação das mesmas é da responsabilidade do Assistente Operacional dos SFH, que vai conferir o número de volumes entregues e o destinatário.

Todos os produtos farmacêuticos (exceto estupefacientes e psicotrópicos e os gases medicinais) são conferidos pela TDT. Os estupefacientes e psicotrópicos são conferidos e armazenados pela farmacêutica responsável pelos mesmos. Os gases medicinais são conferidos e armazenados por um funcionário das instalações e equipamentos.

As não conformidades relativas aos fornecedores são registadas em impresso próprio.

A receção de produtos farmacêuticos implica uma execução técnica e uma execução administrativa. Na execução técnica faz-se uma conferência qualitativa e quantitativa dos mesmos (produto, dosagem, forma farmacêutica, quantidade), confere-se o registo do lote, a validade e a data de receção na guia de entrada rubricando-se a mesma; após conferir a documentação técnica relativa a hemoderivados, estupefacientes, psicotrópicos, benzodiazepinas, produtos químicos e outros regista-se e arquiva-se; verifica-se o estado de acondicionamento dos produtos no ato da entrega (se existem casos de rotura, má rotulagem ou temperaturas impróprias, por exemplo); faz-se a separação dos artigos conferidos de acordo com as diferentes áreas de armazenamento. Na execução administrativa faz-se uma verificação da conformidade da nota de encomenda com a guia de remessa; o registo de entrada de medicamentos na aplicação informática e o arquivo da guia de remessa com o duplicado da fatura.

As validades registadas pelas TDT são transcritas eletronicamente pelo setor administrativo. Mensalmente a TDT coordenadora mapeia os medicamentos que vão expirar validade com três meses de antecedência. Nos serviços, quem controla as validades é o enfermeiro chefe.

É necessário, também, fazer uma conferência qualitativa e quantitativa das matérias-primas com a guia de remessa; assinatura, registo do lote e da validade; registo da entrada do

produto e registo do boletim de análise. No início de cada dia é impresso um mapa com as entradas do dia anterior, o qual é conferido pela TDT.

Em relação à armazenagem dos produtos, todos os parâmetros do MBPFH são cumpridos exceto o sistema de rotação de stocks e de saída de produtos que se faz FEFO - o que expira primeiro sai primeiro. Utiliza-se porta paletes, não automatizado na arrumação dos grandes volumes.

A arrumação nas prateleiras é feita pelo Assistente Operacional sob a supervisão da TDT, de maneira a que não exista contacto direto com o chão e que exista circulação de ar. Esta é feita por ordem alfabética de princípio ativo e conforme a sua especificidade, de acordo com as seguintes áreas: Medicamentos Injetáveis, Formulações Orais e Tópicas, Material de Penso, Medicamentos para Utilização Oftálmica, Medicamentos Citotóxicos, Dietas e Suplementos, Anestésicos e Kardex. Existem também nove áreas de armazenamento especial: Armazém de Soluções de grande volume, Produtos Inflamáveis, Estupefacientes e Psicotrópicos, Soluções Desinfetantes, Produtos Farmacêuticos Termolábeis, Gases Medicinais, Medicamentos de Ensaio Clínicos, Medicamentos para Dispensa no Ambulatório e a Arca (-80°C). Os colírios, os medicamentos citotóxicos e os anestésicos encontram-se em estantes fixas por perigo de queda e derrame; todos os outros medicamentos estão armazenados em estantes móveis e deslizantes.

Os produtos que devem ser conservados ao abrigo da luz, devem ser mantidos nas embalagens originais sempre que possível ou então protegidos com papel de alumínio ou em saco de plástico preto.

Os medicamentos termolábeis são acondicionados no frigorífico ou arca congeladora (membrana amniótica) e são monitorizados por termo-higrómetro com registo contínuo de temperatura e humidade.

Em relação às condições especiais para os estupefacientes, estes têm um sistema de distribuição manual de ficha de prateleira que permite um controlo mais apertado (discutido no ponto 2.4.3.1).

Os medicamentos que expiraram a validade, incluindo os estupefacientes, são retirados e identificados com etiqueta de não conforme no local definido na farmácia; os que são aceites pelos laboratórios são devolvidos a estes, os que não são seguem para incineração de acordo com a legislação em vigor.

2.3 Preparação e controlo de produtos farmacêuticos

2.3.1 Pessoal

Como atrás se disse, estão cinco farmacêuticos responsáveis por esta área. Todas as TDT participam com uma rotação semanal; estão também duas assistentes operacionais afetas a esta área.

Quando fui observar a preparação de alimentação parentérica, tive de me equipar exatamente como o farmacêutico de apoio à Unidade de Nutrição Parentérica (UNP), de acordo com as normas do MBPFH.

Todo o pessoal responsável pela limpeza e manutenção recebe formação contínua, existindo também instruções de trabalho sobre este aspeto.

2.3.2 Instalações, equipamentos e materiais

A preparação, acondicionamento, rotulagem e controlo de manipulados não estereis faz-se no laboratório, com as características descritas no MBPFH. Para além das características constantes no MBPFH, existe ainda no laboratório uma máquina de lavar loiça própria para loiça de laboratório. A área de armazenamento de matérias primas encontra-se separada dos restantes medicamentos e produtos farmacêuticos.

A reembalagem é feita numa sala separada das outras divisões onde se mantêm todas as condições de higiene, limpeza e segurança. Para além das bancadas de trabalho, existe o seguinte equipamento: duas máquinas de reembalagem semiautomáticas (Euclid Spiral e Auto pack MDD auto print) e uma máquina de selar com manga plástica (Futura-Jr).

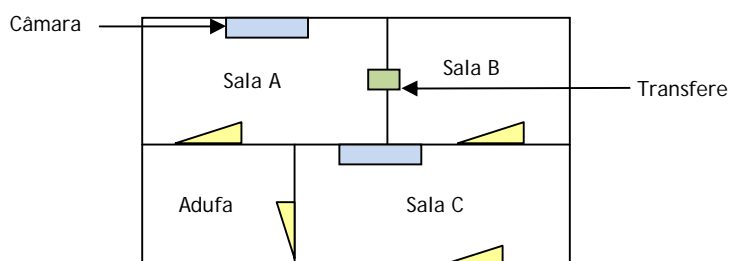


Figura 3 - Esquema da Unidade de Nutrição Parentérica (UNP)

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

A manutenção, a limpeza do material (lavagem com água e detergente), a eliminação do lixo (resíduos químicos em recipientes adequados) e a desinfecção do pavimento são feitas pelas Assistentes Operacionais.

As matérias-primas só podem ser utilizadas depois de se ter verificado se foram adquiridas de acordo com as especificações da Farmacopeia Portuguesa ou Europeia. No dia em que estive a acompanhar a receção de encomendas, o trimetoprim trazia o rótulo incompleto e foi necessário pesquisar as informações que faltavam; entretanto o medicamento ficou de quarentena, sem poder ser utilizado.

O material de acondicionamento e de fecho é lavado na máquina própria de lavar loiça do laboratório antes de ser arrumado no armário da sala de preparação de manipulados para evitar a contaminação.

Os rótulos são impressos na hora, contendo toda a informação necessária.

2.3.3 Documentação

Existem os seguintes documentos: registo dos controlos e calibrações dos instrumentos de medida, registo dos dados referentes às preparações efetuadas e arquivo dos boletins de todas as matérias-primas.

O farmacêutico responsável elabora a ficha de preparação correspondente a cada fórmula magistral e respetivas instruções de trabalho.

Toda a documentação referente a manipulados é arquivada nos SFH no mínimo durante três anos.

Em relação à nutrição parentérica, existe um arquivo da requisição prescrita pelo médico juntamente com a folha da validação farmacêutica dos volumes a preparar resultante da introdução dos dados da prescrição num programa desenvolvido para apoio nesta validação (ver anexo). Existe também um registo dos lotes das matérias-primas / medicamentos utilizados na preparação das soluções parentéricas e do lote de cada solução preparada, um registo de utilização da câmara/UNP e um registo de manutenção dos equipamentos utilizados na UNP.

2.3.4 Métodos de Preparação

Os medicamentos manipulados não-estéreis e as preparações parentéricas são preparados pela TDT com a supervisão de um farmacêutico. Este verifica e interpreta a dose, possíveis incompatibilidades e os procedimentos relacionados com o processo de manipulação. Antes da preparação, a TDT insere os lotes de cada matéria-prima num programa informático que automaticamente gera um número de lote interno sequencial para o novo manipulado a ser preparado.

Efetua-se o fracionamento e reembalagem de especialidades farmacêuticas se no mercado não existir especialidade farmacêutica com igual dosagem ou apresentada sob a forma pretendida e apenas nos seguintes casos:

- Medicamentos manipulados destinados a adequação de uma dose para uso pediátrico
- Medicamentos manipulados destinados a aplicação cutânea
- Medicamentos manipulados destinados a grupos de doentes em que as condições de administração ou farmacocinética se encontrem alterados

O fracionamento de formas sólidas e líquidas é feito pela TDT sob a supervisão do farmacêutico.

A preparação e a diluição de soluções desinfetantes no serviço farmacêutico caiu em desuso porque hoje em dia são utilizados desinfetantes de preparação extemporânea como por exemplo pastilhas de tricloseno de sódio às quais só é necessário adicionar água para preparar a solução desinfetante na concentração pretendida.

O rótulo dos manipulados inclui os seguintes elementos: identificação dos SFH, denominação do preparado oficial ou fórmula do medicamento prescrito pelo médico, forma farmacêutica, via de administração, número de lote atribuído, prazo de validade, quantidade dispensada, condições de conservação e instruções especiais que sejam indispensáveis.

Considera-se fracionamento, modificar a dose de uma especialidade farmacêutica de modo a adaptá-la a um doente em particular.

Considera-se reembalagem o fracionar da embalagem de uma especialidade farmacêutica para que possa ser administrada na dose prescrita pelo médico sem alterar a sua forma farmacêutica.

A reembalagem é feita por uma Assistente Operacional com acompanhamento e supervisão de uma TDT e sob a responsabilidade de um farmacêutico. Quando não é possível dispensar os medicamentos na embalagem de origem, são reembalados de modo a assegurar a sua proteção mecânica, proteção da luz e estanquicidade. Para evitar erros e contaminações cruzadas, na superfície de trabalho apenas existe um medicamento específico e o material necessário para o reembalar. Se existem lotes diferentes do mesmo medicamento estes são reembalados em separado. O rótulo contém os seguintes elementos: nome genérico, forma farmacêutica, dosagem, lote de fabrico, prazo de validade atribuído pelos SFH; se o medicamento permanecer no blister, a validade mantém-se, se o medicamento for retirado do blister a validade passa a ser apenas de seis meses ou inferior a um quarto do tempo de prateleira restante se este for superior a seis meses. Os medicamentos que não estão corretamente reembalados são inutilizados e contabilizados; após cada reembalagem retira-se uma amostra para controlo posterior.

O registo da reembalagem é feito em impresso próprio onde se registe o nome genérico, o laboratório, a dosagem, a forma farmacêutica, a via de administração, o número de lote atribuído pelo fabricante, a validade original, a dose do medicamento reembalado, o número de unidades reembaladas, o prazo de validade atribuído pelos SFH, a cópia do rótulo utilizado na reembalagem, a data de reembalagem e as assinaturas do Assistente Operacional e da TDT. A TDT confere a totalidade dos medicamentos reembalados do primeiro ao último ainda na fita.

As preparações de nutrição parentérica são feitas às segundas, quartas e sextas-feiras numa área asséptica com câmara de fluxo laminar horizontal (CFLH) - ver figura 2.2 - e seguem determinadas regras e ordens de trabalho: ligar a câmara pelo menos 30 minutos antes de se iniciar a preparação, limpar e desinfetar a câmara e todos os equipamentos utilizados no seu interior, o organizar do material no interior da CFLH de modo que aquando do seu manuseamento exista o mínimo de turbulência, de movimentos e de contaminação, inspecionar os frascos, ampolas e outros materiais para deteção de eventuais defeitos, trabalhar pelo menos a 20 cm para o interior da câmara evitando pôr os ombros e a cabeça dentro da câmara e inspecionar a preparação acabada para verificar se existem roturas quer nas bolsas quer nas seringas ou qualquer incompatibilidade física.

Todas as preparações acabadas devem sair do interior da câmara devidamente clampadas e seladas.

Existem dois tipos de soluções: a A e a B. A solução A é constituída por glucose, aminoácidos, cloro, sódio, potássio, fósforo, magnésio, cálcio, oligoelementos, vitaminas hidrossolúveis e heparina; a solução B é constituída por lípidos e vitaminas lipossolúveis infantis.

A heparina é diluída para se obter nova concentração e as vitaminas hidrossolúveis são reconstituídas - normalmente este procedimento já é feito no serviço de neonatologia. A preparação da bolsa inicia-se com a introdução da glucose; os outros elementos são introduzidos pela ordem descendente constante no boletim com os dados da prescrição sendo que o último elemento a introduzir é a água. A heparina só é adicionada na bolsa para o próprio dia; na bolsa para o dia seguinte é já adicionada no serviço. Nas dietas em que conste cloreto de cálcio, este é adicionado em último lugar. A preparação da solução B inicia-se com introdução dos lípidos na seringa/bolsa e posteriormente as vitaminas lipossolúveis. No final da preparação, as bolsas são comprimidas de maneira a que saia todo o ar e fechadas hermeticamente; as bolsas são homogeneizadas por dupla inversão. Todas as soluções são preparadas com volume em excesso para retirar um pouco para análise e para aquele volume que fica nos catéteres.

O tipo de solução parentérica preparada influencia o seu acondicionamento. As soluções A podem ser acondicionadas em bolsas de 200, 250, 500 e 1000 mL, sendo posteriormente acondicionadas em saco escuro ou em papel de alumínio independentemente de existirem ou não produtos fotossensíveis na preparação e guardadas no frigorífico. As soluções B são acondicionadas em seringas opacas de 50 mL, em bolsas de 200 ou 250 mL e em sacos plásticos transparentes e escuros, sendo posteriormente acondicionadas em papel de alumínio, independentemente da existência de produtos fotossensíveis na preparação, e guardadas no frigorífico. Este segundo acondicionamento é feito pelo Técnico de Apoio Externo ou pelo farmacêutico que apoia a UNP.

Todas as preparações são realizadas de acordo com as boas práticas de preparação: lavagem cirúrgica das mãos, equipamento com bata, luvas e máscara descartáveis.

Assisti à preparação uma pomada de ácido fusídico com butirato de hidrocortisona, papéis de Fantomalt[®], uma solução de ácido acético a 3% e bolsas de alimentação parentérica para um bebé prematuro. Ajudei a preparar uma solução de bochechos contendo lidocaína, nistatina e bicarbonato de sódio.

2.3.5 Controlo de Qualidade e validação

O controlo de qualidade das fórmulas magistrais implica a verificação das características organolepticas e a verificação final da massa ou volume de medicamento a dispensar; não são realizados ensaios de esterilidade nem de pesquisa de pirogénios.

Na nutrição parentérica, existem vários passos ao longo do processo que são necessários validar e que correspondem a quatro áreas diferentes: validação físico-química, validação

microbiológica, validação da rotulagem da bolsa e validação qualitativa/quantitativa. Na validação físico-química importa garantir que não existem incompatibilidades entre componentes que possam causar uma instabilidade físico-química da solução. Esta validação muitas vezes é feita pela observação a olho nu de precipitados ou partículas em suspensão no preparado final. A TDT ao preparar a solução deve seguir a técnica de forma rigorosa, respeitando as quantidades e a ordem de introdução dos constituintes; as vitaminas hidrossolúveis, por poderem mascarar as partículas em suspensão, são adicionadas no final. O farmacêutico que apoia a UNP verifica todas as soluções preparadas a contraluz para verificar a existência de partículas em suspensão. Quando estas existem, pede-se a confirmação por outro farmacêutico, e nessa situação a solução é eliminada e produzida outra. O pH não é medido visto não existirem equipamentos que possibilitem tal operação. A determinação da osmolaridade é feita na validação da prescrição através de uma fórmula matemática, como visto anteriormente. Na validação microbiológica, é utilizado um meio de enriquecimento bacteriano designado por *Bact Alert SA* que vai permitir a deteção de fungos, bactérias aeróbias de crescimento rápido e de bactérias aeróbias de crescimento lento; após preparação da primeira bolsa são retirados cerca de 5 ou 10 mL da solução para o interior do tubo de *Bact Alert SA* sendo enviado para o serviço de Patologia Clínica. Sempre que são detetados micro-organismos nas soluções estéreis - quer através da inoculação de placas de gelose e/ou meios de enriquecimento bacteriano - o farmacêutico deve confirmar qual solução e ou bolsa poderá estar contaminada e avisar o Serviço de Neonatologia; se ainda não tiver sido administrada, descarta-se, se já tiver sido, inicia-se antibioterapia de largo espectro. Na validação da rotulagem da bolsa, o farmacêutico compara os rótulos definitivos das soluções A e B com os rótulos provisórios das soluções A e B, de modo a todos os dados estarem de acordo com o bebé em questão. Em relação à validação qualitativa/quantitativa, o farmacêutico confere se nos recipientes dos fármacos utilizados, o que lá falta, corresponde à quantidade utilizada em cada bolsa. Sempre que se detete um problema neste âmbito, as soluções devem ser descartadas e preparadas novas.

Sempre que ocorre algum problema deve notificar-se de imediato o farmacêutico responsável pela UNP e registar o mesmo em impresso próprio.

2.4 Distribuição de medicamentos

“A Distribuição de Medicamentos é o denominador comum e a face mais visível da atividade farmacêutica em todos os estabelecimentos hospitalares” (MBPFH)

2.4.1 Distribuição Individual Diária em Dose Unitária

Por enquanto, só 70 camas (correspondentes a dois serviços - Cirurgia I e Especialidades Médicas) é que se encontram abrangidas por este tipo de distribuição.

O médico envia a prescrição médica online no SGCIM e o farmacêutico, conforme o serviço que está responsável, valida a prescrição desse mesmo serviço. As prescrições, depois de validadas, são enviadas para o Kardex e a TDT faz a preparação individual da terapêutica para 24 horas ou se for 6ª feira, para 72 horas que é colocada na gaveta correspondente a cada doente e na qual se encontra inscrito o seu nome e o número da cama. Cada medicamento está identificado com o nome genérico, a dosagem, o lote e a validade atribuída pela indústria ou a validade atribuída pelos SFH.

Os medicamentos em solução, os injetáveis de grande volume, os de aplicação tópica são repostos fora da cassete e assinalados num impresso próprio para o efeito.

As cassetes das Especialidades Médicas são enviadas às 15 horas e as da Cirurgia I são enviadas às 18 horas. A entrega das cassetes, de toda a medicação fora da cassete e a respetiva folha de registo é feita pelo Assistente Operacional dos SFH. A folha de registo é conferida e assinada pelo enfermeiro de cada serviço. Quando é feita a entrega das cassetes, são recolhidas as cassetes vazias do dia anterior e que se encontram em cada serviço e são devolvidas aos SFH. Quando chegam de novo aos SFH são desinfetadas.

A conferência de uma gaveta de cada ala do serviço é realizada semanalmente pela TDT por amostragem.

A regularização de stocks é feita pela TDT no programa informático; ao final do dia é tirada uma listagem do que é necessário repor no Kardex. A reposição do Kardex é feita diariamente pela TDT. Os medicamentos são repostos por lote e por validade. As listagens de entrada e de incidências de entradas são guardadas durante um mês.

As revertências de medicamentos são feitas pela TDT depois de avaliar o estado de conservação e identificação. É feito por doente e por serviço diariamente.

2.4.2 Distribuição Tradicional de medicamentos

2.4.2.1 Reposição por Níveis

A reposição por níveis é feita nos armazéns avançados (Kambam), no stock de retaguarda e nos stocks de enfermaria. É feita na maioria dos serviços clínicos pois só a Cirurgia I e as

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Especialidades Médicas têm Distribuição Individual por Dose Diária Unitária (DIDDU), como dito anteriormente.

Considera-se armazém avançado, um stock de medicamentos que só existe em determinados serviços e cujo débito de medicamentos é feito automaticamente através do pdt. Este stock não entra no stock normal da farmácia sendo considerado stock do próprio serviço. Considera-se stock de retaguarda aquele stock que existe nos serviços de DIDDU e que é utilizado para alguma emergência ou alteração de terapêutica necessária durante o horário em que a farmácia não se encontra em funcionamento. Considera-se stock de enfermaria todos os stocks que existem nos outros serviços.

A reposição por níveis, por enquanto, é o principal método de distribuição de medicamentos e produtos farmacêuticos.

Os farmacêuticos, em conjunto com os enfermeiros e os médicos de cada serviço clínico definem os stocks máximo e mínimo de cada medicamento e a periodicidade com que os mesmos são repostos.

Tabela 1 - Representação da periodicidade e tipo de reposição em cada serviço

Serviços	Tipo de reposição por nível	Dias da Semana				
		2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a
Urgência Pediátrica	Reposição por nível	x			x	
Urgência Geral	Reposição por nível	x			x	
Medicina I	Reposição por nível		x			x
Medicina II	Reposição por nível	x			x	
Medicina III - Especialidades Médicas	Reposição do nível de retaguarda			x		
Ginecologia	Reposição por nível			x		
Obstetria	Reposição por nível			x		
Unidade de Convalescença	Reposição por nível		x			x
Unidade de AVC	Reposição do nível de retaguarda			x		
Cirurgia I	Reposição do nível de retaguarda		x			x
Cirurgia II	Reposição por nível	x			x	
Bloco Operatório	Reposição por nível	x			x	
Pediatria	Reposição por nível	x			x	
Cardiologia	Reposição por nível		x			x
Consultas Externas	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)			x		
Cirurgia de Ambulatório	Reposição por nível		x			x
Patologia Clínica	Reposição por nível em armazém avançado		x		x	

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

	(Kambam)					
Imagiologia	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)			x		
Hemodinâmica	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)		x			x
Hospital de Dia Quimioterapia	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)	x			x	
DPSM	Reposição por nível			x		
UCI	Reposição por nível	x		x		x
Cirurgia Ortopédica	Reposição por nível		x			x
Cirurgia Oftalmológica	Reposição por nível		x			x
Neonatologia	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)			x		
VMER	Reposição por nível					x
Hospital de Dia Nefrologia	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)			x		
Imunohemoterapia	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)			x		
Técnicas Gastro - Endoscopia	Reposição por nível em armazém avançado (Kambam)			x		
Quarto de Operados	Reposição por nível	x			x	
Radioterapia	Reposição por nível			x		

O enfermeiro chefe de cada serviço faz o pedido de medicamentos e de produtos farmacêuticos para a reposição dos stocks nivelados no programa informático, sendo posteriormente validado pelo farmacêutico em que verifica o número de medicamentos, o tipo de medicamento e a documentação necessária.

Estes são fornecidos por uma TDT e transportados aos serviços pelo Assistente Operacional. Quando existe uma devolução, o farmacêutico verifica as condições dos mesmos.

A cada seis meses é retirada uma lista com os 10 medicamentos mais consumidos e os 10 menos consumidos; o farmacêutico desloca-se aos serviços e verifica se o nível está dentro do limite estabelecido, a validade, o lote e o nome do medicamento. São também analisadas as trocas de medicamentos que ocorreram em cada trimestre.

2.4.2.2 Distribuição Personalizada

Considera-se distribuição personalizada toda a requisição proveniente dos serviços ou justificação de antibiótico só para um doente em específico, respeitando o circuito descrito no MBPFH.

A distribuição de Medicamentos Estupefacientes, de Hemoderivados e de Citotóxicos também é considerada neste hospital como sendo uma distribuição individualizada ou personalizada.

2.4.3 Circuitos Especiais de Distribuição

2.4.3.1 Distribuição de Medicamentos Estupefacientes

Continua-se a reger pela Portaria nº 981/98 de 18 de setembro retificada pela Portaria 1193/99 de 6 de novembro. O Decreto Regulamentar nº 28/2009 de 12 de outubro consiste na terceira alteração do Decreto Regulamentar nº 61/94 de 12 de outubro.

Os Medicamentos Estupefacientes são distribuídos por um dos farmacêuticos e entregues pela TDT.

Quando a farmacêutica responsável os recebe, confere a quantidade pedida e rececionada, o prazo de validade, o lote e verifica as condições da encomenda.

Se a encomenda estiver conforme é acondicionada no cofre dos medicamentos estupefacientes (com código próprio) e anota-se na ficha de prateleira correspondente a quantidade recebida, a data, a existência atualizada e o laboratório fornecedor.

A distribuição destes medicamentos é feita por reposição de stock onde a farmacêutica responsável preenche os seguintes dados na folha do anexo X: número sequencial, nome do serviço requisitante, nome do Hospital, nome por DCI, dosagem, forma farmacêutica, quantidade, código, assinatura e número mecanográfico do farmacêutico e a data. Preenche também na folha de prateleira: o serviço de internamento, a data, a quantidade dispensada, a existência atualizada e o número sequencial do anexo X.

Quando é necessário rótulo, este contém os seguintes elementos: DCI, forma farmacêutica, quantidade, dosagem **E** de estupefacientes.

A medicação é colocada em saco plástico individualizado acompanhada do original e do duplicado do anexo X. O triplicado do anexo X é arquivado no serviço após ter sido feito o registo de saída da medicação numa aplicação informática própria, com segurança na pendrive; fiz este registo supervisionada e sozinha.

Os medicamentos - entregues pela TDT ao enfermeiro - são rececionados pelo enfermeiro de cada serviço requisitante depois das 15 horas, exceto nos casos de urgência. A TDT ou

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

farmacêutico preenche o campo de entrega e o enfermeiro preenche o campo de receção no anexo X.

Quando vêm devolvidos, a farmacêutica responsável verifica as condições de conservação e a validade dos mesmos sendo armazenados de novo no cofre e fazendo as alterações na ficha de prateleira. A nota de devolução é entregue ao administrativo dos SFH para débito na aplicação de Gestão de Stocks.

De três em três meses é enviado ao INFARMED o registo de todo o movimento de medicamentos estupefacientes - entradas, saídas e devoluções juntamente com o ofício efetuado pela CFT.

2.4.3.2 Distribuição de Hemoderivados e de Medicamentos Citotóxicos

A distribuição de Hemoderivados continua a reger-se pelo Despacho nº 11291/97 de 18 de novembro de 1997.

Uma requisição própria para cedência de hemoderivados da Imprensa Nacional Casa da Moeda previamente prescrita pelo médico chega aos SFH. Esta requisição encontra-se dividida em três partes: a prescrição médica (quadro A e B), uma parte respeitante à distribuição do farmacêutico (quadro C) e outra respeitante ao registo de administração feita pelo enfermeiro (quadro D). Nos quadros A e B encontram-se a identificação do médico, a identificação do doente, a descrição do hemoderivado, a duração do tratamento, a dose e a justificação clínica para a prescrição daquele hemoderivado. No quadro C encontram-se o registo de distribuição - número sequencial atribuído internamente àquela distribuição do hemoderivado -, o nome, a dose, o lote e o laboratório de origem/fornecedor do hemoderivado, assinatura do farmacêutico e data de cedência. No quadro D encontra-se o registo de administração dos hemoderivados, conforme já referido. Na altura da cedência, a pessoa que vem buscar o hemoderivado - enfermeiro, assistente operacional - assina a sua receção nesta requisição.

Quando se fornece o hemoderivado, este leva uma etiqueta onde consta a identificação do doente, a identificação dos HESE, a identificação do serviço requisitante, o número da cama, as condições de armazenamento, a data e a assinatura do farmacêutico.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

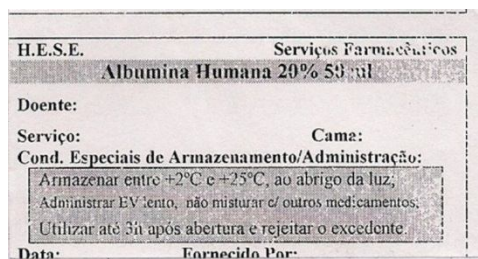


Figura 4 - Modelo exemplificativo das etiquetas utilizadas nas embalagens durante a cedência de hemoderivados.

Tudo isto faz com que seja um circuito com rastreabilidade, que permite se existir um problema após administração - como reações alérgicas -, consigamos saber qual o lote que causou problemas. Um dos grandes perigos dos hemoderivados é o desconhecimento de patologias futuras, que na altura da colheita ainda não existem técnicas para verificar e fazer o screening dessas mesmas patologias.

No HESE, a albumina é utilizada nos seguintes casos: edemas intratáveis, ascite descompensada, hipoalbuminemia grave (Alb sérica <1,5 g/dL) e plasmaferese. As Imunoglobulinas inespecíficas são consideradas terapias de substituição em síndromes de imunodeficiência primária (agamaglobulinemia e hipogamaglobulinemia congénita, imunodeficiência comum variável, imunodeficiência combinada grave, síndrome de Wiskott Aldrich), em mieloma ou leucemia linfocítica crónica associada a hipogamaglobulinemia secundária grave e infeções recorrentes, crianças com SIDA congénita e infeções recorrentes; são cedidas para imunomodulação na correção da contagem de plaquetas na púrpura trombocitopénica idiopática na criança ou no adulto quando existe risco elevado de hemorragia ou antes de cirurgias, na síndrome de Guillain-Barré e na doença de Kawasaki; no transplante de medula óssea alogénico.

As imunoglobulinas específicas utilizadas e as suas indicações são as seguintes:

Tabela 2 - Hemoderivados à base de imunoglobulinas específicas utilizados no HESE e suas indicações clínicas

Hemoderivado	Indicações clínicas
Imunoglobulina anti-D	Prevenção da Doença Hemolítica Perinatal
Imunoglobulina anti-Hepatite B	Prevenção da Hepatite B
Imunoglobulina anti-Tétano	Prevenção e tratamento do tétano
Imunoglobulina anti-Varicela zoster	Prevenção do Herpes Zoster

As proteínas da coagulação utilizadas e suas indicações são as seguintes:

Tabela 3 - Hemoderivados à base de proteínas da coagulação utilizados no HESE e suas indicações clínicas

Hemoderivado	Indicações Clínicas
Complexo protrombínico (fatores II, VII, IX, X)	Hemofilia B; reversão do uso de anticoagulantes; cirrose hepática
Concentrado de fibrinogénio	Septicémia; Coagulação intravascular disseminada
Cola de Fibrina	Cola biológica para uso em cirurgias

As proteínas da anticoagulação utilizadas e suas indicações são as seguintes:

Tabela 4 - Hemoderivados à base de proteínas de anticoagulação utilizados no HESE e suas indicações clínicas

Hemoderivado	Indicações Clínicas
Concentrado de Anti-Trombina III	Tromboses por deficit congénito de proteína C; septicémia
Concentrado de α -1 antitripsina	Enfisema pulmonar por deficit α -1 antitripsina

Todos os medicamentos citotóxicos são manipulados com luvas. Se não são medicamentos de frio, são acondicionados em maletas estanques com a inscrição medicamentos citotóxicos bem visível. Se são medicamentos de frio, são transportados em malas térmicas especiais para o efeito com a inscrição medicamentos citotóxicos. São transportados para os serviços pelos assistentes operacionais.

2.4.3.3 Distribuição de Medicamentos em Ensaio Clínicos

A receção das amostras só é feita após autorização do Conselho de Administração. Estas devem estar corretamente etiquetadas e identificadas com a referência de que se trata de "amostras para ensaio clínico". O rótulo deve conter os seguintes elementos: código do protocolo, número de unidades e forma galénica, via de administração, número do lote, prazo de validade, nome e direção da entidade farmacêutica elaboradora, condições especiais de conservação e a inscrição "amostra para ensaio clínico".

No caso de serem ensaios duplamente cegos, o número de lote e o nome de laboratório produtor não constam do rótulo.

Depois de terem sido feitos os controlos (conteúdo da encomenda, rotulo da amostra), os SFH confirmam a entrega das amostras. Esta confirmação é específica de cada ensaio (pode ser por processo informático ou via telefone).

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Todo este processo rege-se pelas guidelines estudadas na unidade curricular de Farmácia Clínica.

Os documentos necessários para a realização de um ensaio clínico são: autorização do INFARMED, parecer favorável da Comissão Ética para a Investigação Clínica , parecer da Comissão Nacional de Proteção de Dados, documento de consentimento informado, seguro, acordo financeiro, protocolo do ensaio e brochura do investigador.

Neste momento os SFH estão a receber medicação para sete ensaios clínicos - sendo um deles de fase II e os outros seis de fase III - e durante o estágio assisti a uma reunião inicial com os monitores para se começar novo ensaio clínico.

2.4.4 Instalações e equipamentos

Em termos de equipamentos foram abordados ao longo desta secção e da anterior e correspondem aos designados no MBPFH.

Os medicamentos de ensaio clínico são armazenados separados dos restantes medicamentos e cumprindo os requisitos próprios para estes medicamentos acondicionando-se em frigoríficos identificados para esse propósito.

2.5 Ambulatório

"A dispensa de medicamentos a doentes em regime ambulatório, por parte dos Serviços Farmacêuticos hospitalares, surge da necessidade de se fazer face a situações de emergência em que o fornecimento dos mesmos não possa ser assegurado pelas farmácias comunitárias, bem como da necessidade de vigilância e controlo determinadas patologias crónicas, e terapêuticas prescritas em estabelecimentos de cuidados de saúde diferenciados." (MBPFH)

2.5.1 Dispensa de medicamentos, Dispositivos médicos e outros produtos farmacêuticos, Receção e avaliação da prescrição e Registo e controlo da medicação dispensada

O ambulatório tem como horário de dispensa das 9 às 12 e 30 horas e das 14 às 17 e 30 horas. Existem três tipos de cedência em ambulatório: cedência segundo a legislação em vigor - cuja medicação é discutida no ponto 2.5.2 -, venda de medicamentos pela Farmácia Hospitalar - em que são vendidos medicamentos que se encontrem esgotados nas farmácias comunitárias e cujas receitas tragam vários carimbos das mesmas a dizer que este se encontra esgotado e cedência de medicação sujeita a prévia autorização do Conselho de Administração - sempre que não exista legislação própria sobre cedência de medicamentos para tratamento de situações particulares e específicas. Esta cedência pode ser de dois tipos: por patologia, ou seja, nos casos em que existam muitos doentes com a mesma patologia o conselho de administração autoriza um parecer de maneira que as cedências de medicação para essa patologia não necessitem de ir a conselho de administração para aprovação; ou caso a caso em que perante determinado doente e determinada patologia pondera-se o caso de ceder a medicação gratuitamente ao doente. O único caso de cedência por patologia feita por prévia autorização do conselho de administração é do quisto hidático, muito comum no Alentejo. A cedência de medicação prescrita noutros hospitais - desde que seja cumprida a legislação em vigor e que o doente pertença à área de influencia do HESE pode ser feita. A utilização de determinada medicação fora das indicações em RCM pode ser feita desde que o médico justifique clinicamente e informe o doente verbalmente e que este assine um consentimento informado e que o Conselho de Administração, a CFT e/ou a comissão de ética validem, retifiquem e autorizem.

No ato da dispensa é conferida a receita (manual ou eletrónica): vinheta com a identificação do doente, medicamento e posologia e a vinheta com a identificação e assinatura do médico.

O número do processo do doente é inserido no sistema informático e é confirmado: cartão do utente ou subsistema de saúde, contacto telefónico, perfil farmacoterapêutico e legislação inerente à patologia em questão.

A medicação é fornecida para 30 dias, excetuando quando são casos de doentes com diálise peritoneal (os medicamentos são dados para dois meses), doentes oncológicos que não seja a primeira vez que venham buscar a medicação (a medicação pode ser dada até três meses) ou situações previamente autorizadas superiormente.

Em relação aos doentes em hemodiálise, a TDT que se encontra nesse dia no ambulatório vê o perfil farmacoterapêutico de cada doente e envia a medicação correspondente a um mês num saco devidamente identificada. Quando chega ao serviço, um dos farmacêuticos distribui-a

chamando pelo doente correspondente, avaliando assim a adesão à terapêutica e se existem efeitos secundários a registar.

No final de cada dia, a TDT imprime as folhas referentes às receitas do próprio dia que são rubricadas e datadas pelo farmacêutico responsável pela conferência, que é realizada no dia útil a seguir à cedência. O receituário é confrontado com a listagem impressa. Na conferência são vistos os seguintes aspetos: Centro de custo/Serviços, Grupo/Despachos de Ambulatório, Número de registo de cedência, Nome do Doente, Medicação cedida, Quantidades dispensadas, existência de pré-requisitos no ficheiro dos doentes, existência de receitas pendentes. As receitas pendentes são arquivadas em registo próprio. Existe um registo mínimo com preenchimento de dados referentes ao Despacho nº 18419/2010 que é enviado todos os meses ao Infarmed. Após os registos obrigatórios e conferência, as receitas ficam arquivadas até faturação.

A dispensa de receita com prescrição de Talamida obedece a requisitos de um procedimento específico, de acordo com o programa de gestão de risco do laboratório Celgene.

Quando são devolvidos medicamentos no ambulatório, a primeira coisa a fazer é perguntar ao doente o motivo. Deve verificar-se se o medicamento se encontra em boas condições de higiene e se se encontra dentro da validade e a quantidade devolvida. Confere-se o nome do medicamento, o lote e a proveniência. Toda a medicação que necessite de estar no frio é rejeitada. Todo este processo é registado informaticamente.

2.5.2 Medicamentos Legislatos

Os medicamentos legislatos que são dispensados no ambulatório são os constantes no site do INFARMED, correspondendo a outros despachos e existindo introdução de novas patologias do que os constantes do MBPFH: artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artrite idiopática juvenil poliarticular, psoríase em placas, deficiência da hormona do crescimento na criança, síndrome de Turner, perturbações do crescimento, síndrome de Prader-Willi, terapêutica de substituição em adultos, síndrome de Lennox-Gastaut, profilaxia da rejeição aguda de transplante renal alogénico, profilaxia da rejeição aguda de transplante hepático alogénico, doentes com hepatite C, doença de Crohn ativa grave ou com formação de fístulas.

O Despacho nº 9825/98 de 13 de maio que determina o acesso à eritropoetina recombinante foi alterado pelo Despacho nº 6370/2002 de 7 de março. O Despacho nº 12919/98 de 27 de julho foi alterado pelo Despacho nº 5727/2010 de 23 de março que determina a

comparticipação de medicamentos prescritos para a profilaxia da rejeição aguda de transplante renal, cardíaco e hepático alogénico. O Despacho nº 6818/2004 de 10 de março foi alterado pelo Despacho nº 14122/2009 de 12 de junho que determina a comparticipação dos medicamentos destinados à profilaxia de rejeição aguda do transplante renal alogénico, do transplante cardíaco alogénico e do transplante hepático alogénico. O Despacho nº 3/91 de 8 de fevereiro foi alterado pelo Despacho nº 10053/2007 de 27 de abril que determina o acesso aos medicamentos pelos doentes insuficientes renais crónicos e transplantados renais. O Despacho nº 14916/2004 de 2 de julho define as condições de dispensa e utilização de medicamentos prescritos a doentes insuficientes renais crónicos e transplantados renais.

A Portaria nº 469-A/2003 de 9 de junho revoga a Portaria nº 1063/94 de 2 de dezembro referente aos medicamentos para doentes com hemofilia, hemoglobinopatias e lúpus. O Despacho nº 11387-A/2003 de 23 de maio determina o acesso aos medicamentos por parte dos doentes com lúpus, hemofilia ou hemoglobinopatias comparticipados pelo Estado.

O Despacho nº 12455/2010 de 22 de julho que determina as situações patológicas que beneficiam de comparticipação integral na administração da hormona do crescimento revoga o Despacho nº 2623/2010 de 1 de fevereiro que por sua vez revogava o Despacho conjunto de 26 de janeiro de 1993.

Os Despachos nº 25/89 de 18 de julho e nº 32/89 de 18 de novembro foram revogados pelo Despacho nº 4521/2001 de 31 de janeiro que determina o acesso aos medicamentos pelos doentes de polineuropatia amiloidótica familiar (paramiloidose).

O Despacho nº 3837/2005 de 27 de janeiro determina o acesso aos medicamentos Somatulina Autogel, Somatulina LP 30 mg, Sandostatina, Sandostatina Lar e SOMAVERT, para o tratamento da acromegalia.

O Despacho nº 24/89 de 2 de fevereiro determina o acesso aos medicamentos pelos doentes afetados com fibrose quística.

O Despacho 280/96 de 12 de outubro foi alterado pelo Despacho nº 6778/97 de 7 de agosto e este por sua vez foi alterado pelo Despacho nº 5772/2005 de 27 de dezembro que determina o acesso aos medicamentos antirretrovíricos, destinados ao tratamento da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH).

O Despacho nº 10413/97 de 4 de novembro foi alterado pelo Despacho nº 8599/2009 de 19 de março que determina a comparticipação de medicamentos destinados ao tratamento da esclerose lateral amiotrófica (ELA).

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

O Despacho nº 12456 de 22 de julho altera o Despacho nº 11728/2004 de 17 de maio que define as condições de dispensa e utilização de medicamentos para o tratamento da esclerose múltipla.

O anexo do Despacho nº 20510/2008 de 24 de julho que determina a dispensa e utilização de medicamentos prescritos a doentes com artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artrite idiopática juvenil poliarticular e psoríase em placas foi alterado pelo Despacho nº 18419/2010 de 2 de dezembro determina que os medicamentos destinados ao tratamento de doentes com artrite reumatoide, espondilite anquilosante, artrite psoriática, artrite idiopática juvenil poliarticular e psoríase em placas beneficiam de um regime especial de comparticipação. O antagonista do recetor IL-1 Anacinra não é cedido por este hospital. Nestas patologias tem de se fazer o registo mínimo ao abrigo do Despacho nº 18419/2010.

A portaria nº 194/2012 de 18 de abril revê o regime especial de comparticipação de medicamentos destinados ao tratamento da doença de hepatite C.

O despacho nº 4466/2005 de 10 de fevereiro determina o acesso aos medicamentos com a substância ativa infliximab destinado ao tratamento de doentes com a doença de Crohn.

2.5.3 Cuidado Farmacêutico ao Doente de Ambulatório, Informação ao Doente e Farmacovigilância

Os doentes que sofram das seguintes patologias: Hepatite C, Esclerose Múltipla, Esclerose Lateral Amiotrófica, Psoríase em Placas, Espondilite Anquilosante, Artrite Idiopática Juvenil, Artrite Reumatoide e Artrite Psoriática, as que incluem cedência de Talidomida e outras que excecionalmente necessitem de apoio farmacêutico, quando iniciam a terapêutica ou quando esta lhes é alterada, é-lhes ensinado como a hão de efetuar. Juntamente com o ensino, faz-se também a entrega de informação escrita, mala térmica, contentor de resíduos perigosos, autoinjectores (quando aplicável) e cartão com o contacto dos SFH.

Durante o ensino é-lhes explicado a forma como hão de administrar o medicamento, as condições de armazenamento e transporte, o manuseamento de autoinjectores (quando aplicável), os efeitos secundários possíveis e quais as medidas a tomar quando estes aparecem e promoção da adesão à terapêutica. Todos os parâmetros considerados como elementos informativos básicos constantes no MBPFH são dados a conhecer pelos farmacêuticos do HESE aos doentes. Nos doentes que fazem Enbrel® (Etanercept) ou Humira® (Adalimumab) é feito um acompanhamento telefónico posterior. Fiz um acompanhamento de ensino do medicamento Enbrel®.

Sempre que o farmacêutico tenha contacto com um possível problema de qualidade de um medicamento, deve recolher informação sobre o nome do mesmo, o seu lote e o seu prazo de validade e o laboratório responsável.

Quando é detetado um efeito adverso, este é comunicado ao INFARMED ou à Unidade de Farmacovigilância do Sul através do impresso próprio por via telefónica ou online. Os dados a recolher são: datas de administração e/ou suspensão do medicamento suspeito, indicações terapêuticas, dose e vias de administração, medicação concomitante, lote do medicamento, descrição dos efeitos adversos detetados e data de aparecimento e desaparecimento dos mesmos e histórico da atitude tomada e as suas consequências. Esta informação é arquivada na pasta de farmacovigilância. Durante o estágio deram-me a resolver cinco possíveis casos de reações adversas por erro de medicação.

2.6 Centro de Informação de Medicamentos

"A informação sobre medicamentos é uma atividade tipicamente farmacêutica. O farmacêutico sempre tem proporcionado informação ao doente e conselhos sobre o uso dos medicamentos." (MBPFH)

Nos SFH não existe um espaço físico definido para o Centro de Informação de Medicamentos (CIM), estando agora a ser implementados os Serviços de Informação de Medicamentos.

As consultas são realizadas por telefone, pessoalmente ou por escrito, sendo a primeira forma a mais comum. O registo por escrito ainda não é feito mas na altura do estágio existiam duas farmacêuticas a desenvolverem esta área, visto o HESE ser um Hospital Central e ser-lhe colocado um nível de exigência maior.

A forma como é feita a consulta é a que consta do MBPFH.

Por enquanto, ainda não é feito Boletim de Informação Terapêutica.

Neste âmbito, desenvolvi juntamente com outra colega de estágio, uma instrução de trabalho e respetivos posters sobre condições de armazenamento e transporte de gases medicinais (ver anexo).

Para além dos livros mencionados no MBPFH, existem também outros livros e outras publicações, como por exemplo: The Merck Index, Manual de Antibióticos Antibacterianos, Simposium Terapêutico, Índice Nacional Terapêutico, Prontuário Terapêutico 10, Handbook of Drug Administration via Enteral Feeding Tubes, British National Formulary 51, The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 20, The Sanford Guide to HIV/AIDS 2012, Informação sobre Medicamentos, Manual de Antídotos, Legislação Farmacêutica Hospitalar, Mapa Terapêutico 2011 e Informação sobre medicamentos CIM junho de 2006.

Particpei em quatro formações nos SFH: Novas Abordagens terapêuticas no tratamento da Hepatite C: telaprevir; Tapentadol - Nova Molécula no Tratamento da Dor; Comunicação Eficaz - A importância no quotidiano dos profissionais de saúde e Victrelis® (boceprevir) - an Overview.

2.6.1 Visita Médica

Aquando da visita médica, o farmacêutico pode intervir em todos os aspetos relacionados com o medicamento: dose, posologia, indicação e alternativas terapêuticas, horário de administração, interações, estabilidade, conservação, diluições...

Antes de cada visita é necessário prepará-la, consultando os processos dos doentes e analisando todos os parâmetros descritos no parágrafo anterior. Existe um estudo mais aprofundado dos doentes polimedicados, dos doentes com doenças concomitantes ou doentes a fazerem medicação com intervalos de segurança estreitos.

Durante a visita, cada médico apresenta os doentes e as informações mais relevantes; sempre que for pertinente, o farmacêutico intervém na análise da terapêutica do doente.

Particpei em três visitas médicas: a visita da Pediatria e da Neonatologia, a visita da Cirurgia I e a visita da Medicina II. Destas três, a única que é realizada cama a cama do doente é a visita de cirurgia I, as outras são realizadas no gabinete médico. Embora efetuadas de modo diferente, em todas se discutem os casos dos doentes caso a caso da mesma forma.

2.7 Discussão e Conclusões

A validação de terapêuticas na dose unitária foi bastante útil para rever patologias e terapêuticas associadas e para aprender novas patologias (eventração, ptose mamária, actinomicose pulmonar, por exemplo) e, no âmbito da formação contínua, não descontinuar o estudo.

Na farmácia hospitalar existe um maior seguimento do doente - uma vez que se tem acesso ao processo clínico do mesmo - e enquanto este se encontra internado é mais fácil avaliar terapêuticas, ajustar doses e monitorizar efeitos adversos e adesão à terapêutica.

Ao dispensar terapêutica apenas para um mês no ambulatório, permite um maior seguimento do doente, garantindo que este adere à terapêutica.

Devido à preparação obtida com a Unidade Curricular de Prevenção e Terapêutica, foi mais fácil resolver os casos clínicos de possíveis reações adversas. Esta vertente das Ciências Farmacêuticas interessou-me bastante, sendo uma área em que me vejo a trabalhar futuramente.

3 Estágio em Investigação: A oxidação de esteróides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

3.1 Introdução

3.1.1 Radicais Livres, Neoplasias Malignas e Patologias do Sistema Nervoso

O *stress* oxidativo, segundo Halliwell, pode ser definido como um distúrbio no balanço prooxidante - antioxidante, favorecendo o primeiro e, conseqüentemente, levando a dano celular potencial, que ocorre a nível molecular e que pode ser causado por ataque direto de espécies reativas formadas durante o *stress* oxidativo. Este pode resultar de um nível diminuído de antioxidantes e/ou de uma produção aumentada de espécies reativas. Existem três conseqüências possíveis para o *stress* oxidativo: adaptação por parte da célula ou organismo pelo seu sistema de defesa, dano celular em algum ou em todos os componentes celulares ou morte celular, quer por apoptose quer por necrose (Halliwell, 2004).

As espécies reativas geralmente associadas ao *stress* oxidativo são espécies reativas de oxigénio (ROS). Existem seis espécies reativas major de oxigénio que podem levar a danos oxidativos no corpo humano: anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), radicais peróxido (ROO^{\cdot}), radical hidroxilo (HO^{\cdot}), oxigénio singuleto (1O_2) e peróxido de nitrito ($ONOO^{\cdot}$). Este último forma-se pela reação do anião superóxido com o óxido nítrico. O peróxido de hidrogénio é relativamente inerte a baixas concentrações mas pode gerar o radical hidroxilo, nomeadamente quando reage com o ferro na conhecida reação de Fenton. O oxigénio singuleto pode ser gerado quando o oxigénio molecular é exposto à luz ou a compostos fotossensibilizadores; esta forma de oxigénio tem sido indicada como sendo a responsável pela formação de cataratas e degeneração macular, por alguma fotossensibilidade quando são ingeridos certos fármacos e pelo dano da pele dependente da luz Ultra-Violeta (Huang, 2005). De destacar ainda que o peróxido de hidrogénio atravessa rapidamente as membranas celulares, contrariamente ao $O_2^{\cdot-}$ (Halliwell, 2004). Apesar de as ROS não serem todas radicais livres (Halliwell, 2004), estes são os mais relevantes, sendo átomos ou moléculas que contêm eletrões desemparelhados nas suas orbitais mais exteriores, tornando-os bastante reativos, designadamente, com os lípidos membranares, com os ácidos nucleicos e com as proteínas (Schipper, 2004).

Atualmente aceita-se que as ROS estão associados ao envelhecimento e ao surgimento e desenvolvimento de várias patologias, nomeadamente oncológicas e do sistema nervoso central (Ex: doenças de Alzheimer e de Parkinson) (Halliwell, 2004; Butterfield, 2001; Valko, 2007).

As patologias oncológicas são uma das maiores causas de mortalidade nos países desenvolvidos; porém, a terapia anticancerígena utilizada atualmente atingiu um *plateau*. De facto, as taxas de resposta continuam baixas para determinados tipos de cancros e a terapêutica não é totalmente eficaz e curativa. Adicionalmente, cada vez mais se tem verificado que cada tumor de cada indivíduo é genética- e fenotipicamente diferente (Miki, 2012).

A oncogénese é um processo de múltiplas etapas, nas quais as ROS deverão participar, que refletem alterações genéticas que conduzem a uma transformação progressiva das células humanas normais em células malignas. De facto, os genomas de células tumorais estão invariavelmente alterados em vários sítios, tendo sofrido disrupção funcional, tendo estas células defeitos nos circuitos reguladores que governam a sua proliferação normal e a homeostase (Hanahan, 2000).

Dentro dos vários tipos de tumor que se conhecem, podem destacar-se os tumores da mama e da próstata, por terem elevadas taxas de mortalidade (Instituto Nacional de Estatística), o que tem justificado o número elevado de estudos nestes temas.

"O cancro da mama é uma das doenças com maior impacto na nossa sociedade, não só por ser muito frequente, e associado a uma imagem de grande gravidade, mas também porque agride um órgão cheio de simbolismo, na maternidade e na feminilidade." (liga portuguesa contra o cancro). Algumas mulheres apresentam um risco aumentado para sofrerem desta patologia que parece estar associado a determinados fatores, nomeadamente: idade (a possibilidade de ter cancro da mama aumenta com a idade), história familiar (o risco é aumentado se a mãe, tia ou irmã tiveram cancro da mama especialmente em idades mais jovens ou outros familiares do lado materno ou paterno), história pessoal de cancro da mama (uma mulher que já tenha tido cancro numa mama tem maior risco de o ter na outra mama), raça (ocorre com maior frequência nas mulheres caucasianas), alterações genéticas e outras, história menstrual longa, primeira gravidez após os 31 anos, utilização de terapêutica hormonal de substituição, radioterapia no peito, densidade da mama, inatividade física, obesidade pós-menopausa e bebidas alcoólicas (American Cancer Society, 2011; liga portuguesa contra o cancro). O seio é constituído, nomeadamente, por lóbulos (as glândulas produtoras de leite materno), por ductos que ligam os lóbulos ao mamilo e outras estruturas. A maioria das massas tumorais mamárias é benigna, no entanto, existem outras massas tumorais, designadas por carcinomas *in situ*, que se encontram geralmente confinadas aos ductos (carcinoma ductal *in situ*) ou confinadas aos lóbulos (carcinoma lobular *in situ*). A maioria dos tumores de mama malignos é invasiva ou infiltrante, atravessando os lóbulos ou os ductos ou as paredes glandulares invadindo os tecidos adjacentes. Quando o tumor maligno é pequeno e ainda se encontra na fase inicial, a mulher pode não apresentar sintomas;

quando o tumor atinge um tamanho palpável, o sinal físico mais comum é um nódulo não doloroso. Os sinais e sintomas menos comuns incluem dor ou sensação de peso no seio, mudanças persistentes na fisionomia do seio como inchaço, endurecimento ou vermelhidão da pele e anormalidades nos mamilos como descargas espontâneas, erosão e inversão (American Cancer Society, 2011). Os estrogénios desempenham um papel deveras importante não só no desenvolvimento normal da mama como também no desenvolvimento de cancro da mama, pois cerca de 70% dos tumores de mama são positivos para o recetor de estrogénio (Kirma, 2011).

O cancro da próstata é uma neoplasia maligna frequentemente dependente de androgénios, e que tem uma latência prolongada entre a transformação inicial maligna e a sua expressão clínica. A maioria dos doentes em estado inicial encontra-se assintomática porque a maioria destas neoplasias tem origem na zona periférica da glândula; o tumor também pode ter origem na zona de transição ou pode estender-se de uma localização periférica para invadir a zona da uretra prostática e produzir sintomas obstrutivos. Os sintomas iniciais consistem em sensação de esvaziamento incompleto, urgência e frequência urinárias, noctúria, disúria e incontinência (Micholki, 2012).

Alguns riscos potenciais para o cancro da próstata são: idade avançada, hiperplasia benigna da próstata, história familiar de cancro da próstata, fatores hormonais, exposição ocupacional e vasectomia (Micholki, 2012).

O cérebro, por consumir uma grande percentagem do oxigénio inspirado, ser rico em ácidos gordos polinsaturados, necessitar de iões metálicos para a sua fisiologia, ser relativamente pobre em antioxidantes e ser composto maioritariamente por células não-mitóticas, está especialmente vulnerável ao *stress* oxidativo (Butterfield, 2001).

A senescência cerebral pode ser resultado do aumento do *stress* oxidativo intrínseco e de uma diminuição das capacidades antioxidantes de defesa (Butterfield, 2001), predispondo o cérebro para um largo espectro de patologias neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (DA) e a Doença de Parkinson (DP), que são duas das mais comuns e devastadoras patologias neurodegenerativas do mundo atual. Infelizmente, ainda não são conhecidas intervenções terapêuticas que sejam cem por cento eficazes de modo a prevenir, atenuar ou reverter a depleção neuronal associada a estas patologias (Schipper, 2004).

Existe uma correlação bem documentada entre dano oxidativo, deposição férrica e insuficiência mitocondrial e o envelhecimento do sistema nervoso central normal dos mamíferos (Schipper, 2004; Butterfield 2001), existindo também uma vulnerabilidade regional seletiva dentro do próprio sistema nervoso. Esta situação ocorre preferencialmente nos gânglios basais, no hipocampo e em alguns núcleos cerebelares (Schipper, 2004). Alguns estudos evidenciam que os péptidos β -amiloides, associados à DA, causam *stress* oxidativo e neurotoxicidade nos sistemas neuronais. Além disso, na DP, o *stress* oxidativo e a agregação das proteínas α -sinucleínas (resultante da nitração das mesmas, destruindo a sua estrutura

secundária) podem também ser dois processos sinérgicos entre si, sendo que a α -sinucleína tem sido associada à toxicidade celular na DP da mesma forma que a proteína β -amiloide na DA (Butterfield, 2001).

A DA representa a forma mais comum de demência, consistindo numa desordem neurodegenerativa progressiva que destrói as células neuronais, levando a problemas de memória e do comportamento; nos estados severos, as atividades do dia-a-dia (incluindo o trabalho), as relações familiares e sociais ficam afetadas. A característica mais proeminente desta patologia é um prejuízo precoce da memória episódica que se manifesta por omissões repetidas e dificuldade em aprender e apreender nova informação. À medida que a patologia progride, os sintomas tornam-se mais persistentes e existe maior dificuldade em completar tarefas diárias mais complexas tais como usar transportes públicos e realizar transações financeiras (Galvin, 2012).

Os sintomas mais comuns são: perda de memória, problemas com a linguagem e com o pensamento abstrato, dificuldade em realizar tarefas, desorientação espaço-temporal, mudanças de humor, personalidade e/ou comportamento - alucinações, vagueamento, agressão, agitação, ansiedade, psicose, fraco discernimento e perda de iniciativa. Os fatores de risco incluem ser do sexo feminino, idade, gene da apolipoproteína E4, dano cerebral prévio, hiperhomocisteinemia, hipertensão, diabetes, tabaco e história familiar de DA. Ao nível do diagnóstico, verificam-se mudanças estruturais cerebrais visíveis em ressonâncias magnéticas, com envolvimento extensivo do lobo médio temporal, e mudanças nos biomarcadores existentes no líquido encéfalo-raquidiano: uma diminuição no péptido β -amiloide circulante e um aumento nas proteínas τ e τ -fosforilada, que podem ser os primeiros sinais de DA (Galvin, 2012). A patogénese da DA está associada à geração basal de ROS pelas mitocôndrias senescentes, deposição acelerada de proteína β -amilóide, produção de citocinas pró-inflamatórias e de ácido nítrico pela microglia activada e sequestro excessivo de ferro no pró-encéfalo e nos córtices de associação (Schipper, 2004).

Actualmente, apesar das intervenções farmacológicas e comportamentais não prevenirem a progressão da patologia, o seu uso pode levar à estabilização da mesma e ao atraso da progressão dos resultados funcionais, cognitivos e comportamentais, melhorando a qualidade de vida dos doentes (Galvin, 2012).

A Doença de Parkinson foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson, existindo quatro características fundamentais: tremor em descanso, rigidez muscular, acinesia e instabilidade postural (Jankovic, 2008). A DP Consiste numa desordem do movimento de início tardio e de etiologia parcialmente desconhecida e caracteriza-se pela degeneração progressiva dos neurónios dopaminérgicos na substancia nigra, formação de inclusões fibrilares intraneuronais (corpos de Lewis) e depleção variável de noradrenalina e serotonina. Nesta patologia ocorre um dano oxidativo, uma falência bioenergética e um sequestro de ferro independente da transferrina nos tecidos afetados. Como fatores

contribuintes para este dano temos ROS derivadas do turnover acelerado da dopamina (H_2O_2 , *orto*-quinonas) (Schipper, 2004).

A bradicinesia refere-se à lentidão de movimento e é o traço mais característico da DP. Engloba dificuldades em planejar, iniciar e executar movimento e dificuldades em realizar tarefas sequenciais e simultâneas. Como manifestação inicial temos lentidão em realizar atividades diárias e tempos de reação mais lentos. O tremor em descanso é o sintoma mais comum e mais facilmente reconhecido. Estes tremores são unilaterais e mais proeminentes na parte distal das extremidades, podendo envolver também os lábios, o queixo, o maxilar e as pernas, desaparecendo com a ação e durante o sono. A rigidez é caracterizada pela resistência aumentada que pode estar associada a dor. Pode também ocorrer rigidez do pescoço e tronco (rigidez axial), resultando em posturas axiais anormais. Como manifestação dos estádios tardios, ocorre instabilidade postural devido a perda dos reflexos posturais (Jankovic, 2008). A terapêutica para esta patologia também não é curativa, e pode envolver a utilização de levodopa, um inibidor da catecol-*O*-metiltransferase, combinado com um inibidor da DOPA-descarboxilase periférica, de amantadina, de inibidores da monoamina oxidase tipo-B ou mesmo um agonista dopaminérgico (Wells, 2009).

O *stress* oxidativo já foi associado também a outras patologias neurodegenerativas relacionadas com a idade, como a esclerose lateral amiotrófica e a doença de Huntington (Schipper, 2004).

3.1.2 Esteroides

Os esteroides são constituídos por quatro anéis fundidos (A, B, C e D) que no seu conjunto se denominam ciclopentanoperhidrofenantreno tetracíclico - um ciclopentano de cinco membros e três anéis de fenantreno (Figura 5) (Foye, 2002). Geralmente, todos os anéis dos esteroides que ocorrem naturalmente têm conformação em cadeira; os anéis B, C e D têm habitualmente fusão *trans* em relação uns aos outros (Patrick, 2005). Estes compostos têm frequentemente 8 carbonos estereogénicos - 3, 5, 8, 9, 10, 13, 14 e 17 -, sendo que a configuração de certos substituintes pode variar, especialmente para os substituintes no carbono 3 e no carbono 17 (Avendaño, 2001).

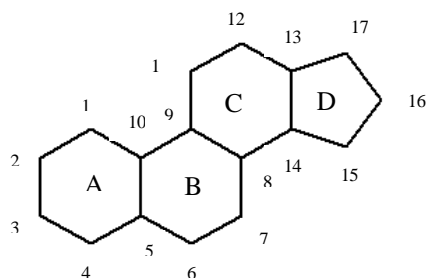


Figura 5 - Núcleo esteroide e respectiva numeração de carbonos

Estes compostos estão presentes no organismo em concentrações baixas, exercendo efeitos fisiologicamente importantes nos tecidos a eles sensíveis. No organismo humano existem três classes principais: os esteroides da série pregnano que contêm 21 carbonos, os esteroides da série androstrano que contêm 19 carbonos e os esteroides da série estrano que contêm 18 carbonos (Figura 6).

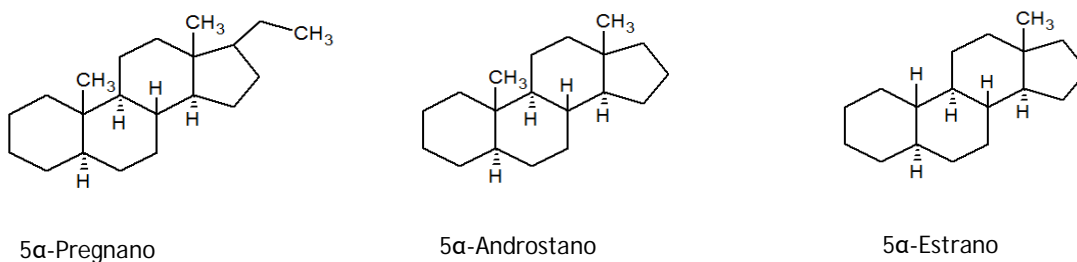


Figura 6 - Núcleo base das principais classes de esteroides existentes no organismo humano

O precursor fisiológico destes esteroides é o colesterol, o qual pode ser obtido da dieta ou biossintetizado no organismo humano (Avendaño, 2001).

O colesterol livre, proveniente da circulação ou sintetizado no córtex adrenal, é convertido no interior das mitocôndrias existentes no córtex suprarrenal a pregnenolona por clivagem enzimática da cadeia lateral (Figura 7). Este passo é o passo limitante na biossíntese de hormonas esteroides (Avendaño, 2001).

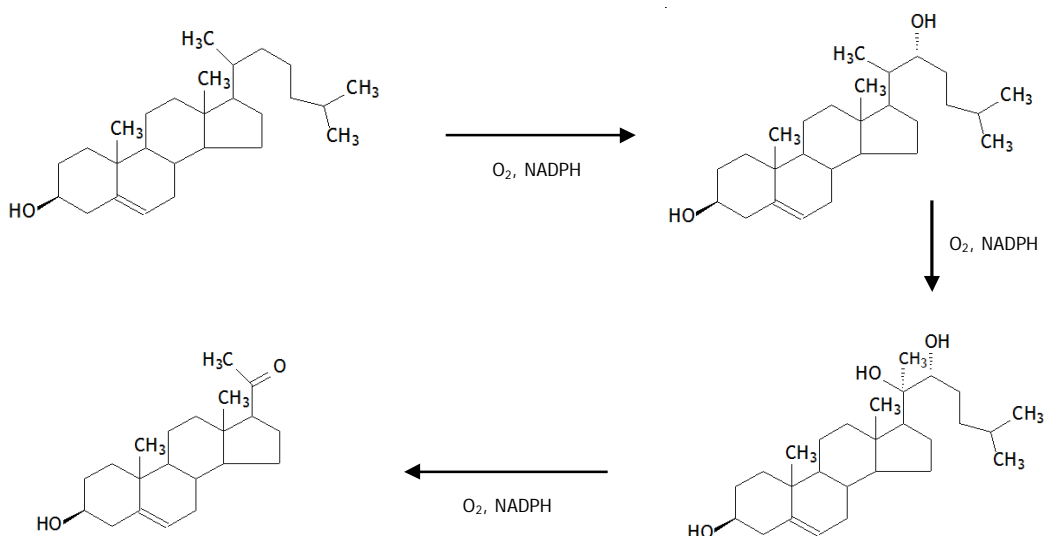


Figura 7 - Biotransformação do colesterol em pregnenolona

Uma vez formada, a pregnenolona é o precursor comum para a formação dos adrenocorticoides e das outras hormonas esteroides. Este esteroide com 21 carbonos é convertido através de oxidações enzimáticas e isomerizações de ligações duplas a um número significativo de esteroides fisiologicamente ativos. Por clivagem oxidativa da cadeia lateral da pregnenolona (e da progesterona), obtêm-se esteroides que contêm 19 carbonos designados por androgénios (Ex: desidroepiandrosterona) (Lathe, 2001). Os esteroides que contêm 18 carbonos têm origem na aromatização do anel A dos androgénios (Foye, 2002). As hormonas esteroides, uma vez produzidas, podem ser transportadas até às suas células-alvo ligadas a proteínas mas difundem-se para a célula na forma de esteroides livres.

As hormonas esteroides foram descobertas durante as investigações sobre o sistema endócrino dos mamíferos; o seu isolamento e a sua caracterização ocorreram durante os anos 30 e 40 do século XX (Avendaño, 2001). Estas hormonas apresentam elevada seletividade tecidual, sendo a sua principal função regular a expressão génica específica dos tecidos: vão entrar na célula, e através da sua ligação aos seus recetores, vão, sobretudo, influenciar a síntese proteica. (Patrick, 2005).

Quase todos os fármacos com estrutura esteroide são preparados por semissíntese a partir de matérias-primas naturais que contêm o núcleo esteroide, provenientes, por exemplo, de plantas do género *Dioscorea* (Avendaño, 2001). Destas plantas extrai-se uma saponina, da qual se obtém a diosgenina, um esteroide espirostando que é utilizado como precursor sintético industrial dos fármacos esteroides. Esta molécula exerce efeitos antiproliferativos em vários tipos de linhas celulares cancerígenas, como as células K56, de leucemia humana, as HT-29, de cancro do cólon, as 1547, de osteossarcoma e as M4Beu, de melanoma (Minorics, 2010).

Alguns esteroides, naturais e mesmo alguns sintéticos têm sido associados a ações antioxidantes marcadas. Por exemplo, alguns esteroides antioxidantes foram extraídos de plantas, como por exemplo das partes aéreas de *Cleome arábica* (Djeridane, 2011) e, outros foram sintetizados combinando derivados do 6-oxoestradiol com ácido salicílico (Gasi, 2012).

3.1.3 Importância biológica de Δ^5 -esteroides e seus derivados 7-oxidados

Tal como referido acima, alguns Δ^5 -esteroides são produzidos no organismo humano, desempenhando papéis relevantes na fisiologia, nomeadamente por se transformarem em hormonas sexuais. Neste grupo inclui-se, por exemplo, o colesterol, a pregnenolona e a desidroepiandrosterona (DHEA). De facto, a DHEA (esteroide da série androstano) é um dos esteroides mais relevantes no organismo humano, sendo o esteroide mais abundante na circulação sanguínea. Este composto pode ser produzido endogenamente principalmente no córtex adrenal, nas gónadas, no cérebro e no trato gastrointestinal e funciona como precursor fisiológico na biossíntese de androgénios mais potentes e de estrogénios via androst-4-eno3,17-diona. Estudos experimentais e clínicos em humanos e noutros mamíferos utilizando este composto e a sua forma sulfatada mostraram que são esteroides multifuncionais, estando implicados em diversas situações, como diabetes, neuroprotecção, obesidade, inflamação, metabolismo lipídico e efeitos antitumorais (Kihel, 2011). No cérebro, a DHEA e a pregnenolona são sintetizadas independentemente das glândulas adrenais e da ação das gónadas, pois sabe-se, designadamente, que a expressão e atividade da enzima 17 α -hidroxilase-C17,20-liase - responsável pela conversão da pregnenolona em DHEA - existe em níveis indetetáveis no cérebro adulto (Cascio, 2001).

Entre os metabolitos da DHEA, os esteroides 7 α -OH-DHEA e 7 β -OH-DHEA são dos mais abundantes e desempenham papéis importantes, por exemplo, no sistema nervoso central (Morfin, 2001). Estes metabolitos juntamente com a 16 α -OH-DHEA encontram-se no líquido encefalo-raquidiano e variações nos seus níveis podem contribuir para o diagnóstico de patologias neurodegenerativas podendo mesmo ser utilizados para diagnóstico diferencial na DA (Kim, 2003). Estão documentados efeitos neuroprotectores relacionados com os metabolitos da DHEA, quer *in vivo* quer *in vitro* (Kihel, 2011), de tal forma que os metabolitos 7-hidroxilados são considerados como possíveis mediadores de alguns dos efeitos neuroprotectores da DHEA no cérebro (Jellinck, 2001) atuando como agentes locais (Trincal, 2002; Pringle, 2003). No entanto, o seu mecanismo de neuroprotecção de modo a prevenir dano celular ainda não está bem explícito (Dudas, 2004). Em estudos envolvendo animais, a DHEA e a pregnenolona mostraram promover a plasticidade e a memória, sendo que os seus níveis sanguíneos decrescem marcadamente com a idade nos primatas. Partindo deste

pressuposto, a diminuição dos níveis sanguíneos destas hormonas pode estar relacionada com o declínio cognitivo relacionado com a idade (Lathe, 2001).

Neste contexto, é de realçar que a DHEA e o seu 7 α -hidroxiderivado mostraram ter também ação antioxidante no intestino e no fígado de ratos (Pelissier, 2003 e 2006). Além disso, também está descrito que a diosgenina tem efeitos protetores em modelos animais de hiperlipidémia e em células endoteliais vasculares contra a apoptose induzida por peróxido de hidrogénio (Gong, 2010).

Além dos 7-hidroxiesteróides, os derivados Δ^5 -7-cetonas são também compostos com interesse biológico elevado, podendo esta funcionalidade ser o cerne da atividade biológica dos oxisterois e também de derivados androgénicos oxidados (Arsenou, 2003b). Estes compostos podem encontrar-se em muitos tecidos animais e géneros alimentícios (Arsenou, 2003a). Alguns deles têm ação inibitória da biossíntese de esteroides (Salvador, 2006), e podem ter utilização na terapêutica (Salvador, 2005), como por exemplo como antitumorais, pois podem inibir a atividade da aromatase e de outras enzimas da biossíntese de esteroides e a replicação celular (Arsenou, 2003b). Em alguns estudos, observou-se que os derivados oxidados são mais tóxicos para as células cancerígenas do que para as células normais, apresentando atividade citotóxica seletiva e também atividade antiproliferativa (Silvestre, 2007). Noutros estudos, observou-se que a introdução do grupo 7-oxo aumentou significativamente a atividade antileucémica dos mesmos em comparação com os análogos não oxidados, continuando com baixos níveis de toxicidade. Nos EUA, a 7-oxo-DHEA encontra-se comercializada como nutracêutico, podendo ser utilizada em terapias de emagrecimento (Salvador, 2006). Além disto, a DA e as certas imunodeficiências podem também ser tratadas com estes esteroides. (Salvador, 2006). Os 7-oxoesteroides, de facto, são um dos grupos mais estudados nas últimas décadas, sendo também utilizados como intermediários na síntese de muitas moléculas com atividades biológicas distintas designadamente derivados 7-aminocolesténicos, compostos 7-oxidados, derivados 7-[O-(carboximetil)oxima], 7,7-gem-difluoroesteroides da série androstano e pregnano e guanidinas esteroidais (Silvestre, 2007).

3.2 Objetivos

Como a modificação do anel B do núcleo esteroide tem um papel importante na atividade biológica de esteroides, especialmente nas posições 6 e 7 (Lathe, 2001), um dos objetivos deste trabalho foi modificar a DHEA, a pregnenolona e a diosgenina em C7 através de reações de oxidação alílica para se obterem os 7-oxoderivados. Dado que esta oxidação é um processo que envolve radicais livres (Arsenou, 2003a) e dada a hipótese de estes compostos poderem ter origem *in vivo* a partir de esteroides precursores não oxidados com potencial atividade

antioxidante e antitumoral (Lathe, 2001), também se efetuou a avaliação da sua ação antioxidante e antitumoral, comparando com as moléculas precursoras.

A sua atividade antioxidante *in vitro* foi avaliada pelo método do DPPH; os seus efeitos na proliferação celular *in vitro* em linhas cancerígenas hormono-dependentes (MCF-7 e LNCaP) e fibroblastos da derme humana normais (NHDF) foram estudados pelo método MTT.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Materiais e Reagentes

Todos os reagentes foram utilizados conforme recebidos, sendo de pureza analítica. O metanol foi adquirido à AnalaR NORMAPUR; o etanol era proveniente da Fábrica de Álcool Manuel Vieira e Companhia. O diclorometano, o éter de petróleo e o éter dietílico foram adquiridos à Fisher Chemical.

Os esteroides DHEA, diosgenina e acetato de pregnenolona foram adquiridos à Sigma Aldrich Co.

Todas as leituras dos ensaios de DPPH foram realizadas a 515 nm no espectrofotómetro UV-1700 Pharma Spec utilizando metanol como branco.

Para a análise por TLC (cromatografia em camada fina) foram utilizadas placas comerciais Kieselgel 60 K₂₅₄ da Merck. Estas placas foram observadas à luz ultravioleta (UV) a 254 nm e reveladas utilizando uma mistura de etanol com ácido sulfúrico (95:5) seguido de aquecimento a 120°C.

Os espectros de NMR foram registados a 400MHz para ¹H-NMR e a 100MHz para ¹³C-NMR num espectrofotómetro Bruker XS 400 utilizando CDCl₃ como solvente. Os dados dos espectros são apresentados na seguinte ordem: desvio químico em ppm, multiplicidade e atribuição da molécula. Os dados dos espectros de ¹³C são apresentados na seguinte ordem: desvio químico e carbono respetivo. Os espectros IV foram registados num espectrofotómetro Smart iTR Nicolet iS10 pelo método ATR e os dados são apresentados pela frequência máxima, expressa em cm⁻¹.

Na cromatografia em coluna utilizou-se gel de sílica (230-400 Mesh, Merck). O eluente encontra-se indicado como proporção v/v de solventes.

3.3.2 Síntese química

Considerando os substratos em causa e a reação pretendida, a forma mais eficiente para a efetuar consiste na transformação direta dos Δ^5 -esteroides aos correspondentes 7-oxo Δ^5 -esteroides por meio de reações de oxidação alílica.

A oxidação alílica consiste na produção de álcoois alílicos, éteres, ésteres e carbonilos α,β -insaturados pela formação de uma ligação C-O - não existente na molécula original - em posição alílica a um grupo funcional (Silvestre, 2007).

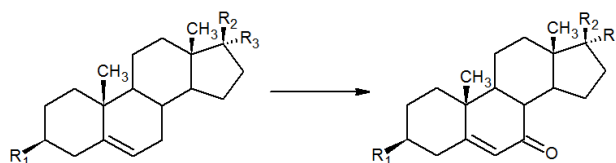


Figura 8 - Oxidação alílica de Δ^5 esteroides (adaptado de Salvador, 2006)

Os processos descritos na literatura para oxidar alcenos a enonas, particularmente Δ^5 -esteroides aos seus 7-oxoderivados, envolvem maioritariamente a utilização de reagentes de crómio(VI) em condições estequiométricas e processos que combinam hidroperóxidos com catalisadores metálicos (Salvador, 2006). Dadas as desvantagens associadas à utilização de reagentes de crómio(VI) (sobretudo por este metal ser carcinogénico) e as vantagens dos processos catalíticos, decidiu-se optar por esta segunda forma de oxidação. Um oxidante habitualmente utilizado é o hidróxido de *t*-butilo (TBHP), pois é livremente solúvel em solventes orgânicos, tem originado boa seletividade reacional, não sofre decomposição não produtiva significativa e permite uma boa purificação dos produtos obtidos (Arsenou, 2003). Dentro dos vários catalisadores metálicos que se podem combinar com o TBHP nesta reação, destacam-se sais de cobre, de ruténio, de cobalto e mesmo de bismuto. Estes últimos têm a vantagem de serem mais seguros pois não são tóxicos nem carcinogénicos (Salvador 2006). Especificamente, o BiCl_3 tem sido combinado com TBHP, permitindo obter rendimentos elevados de 7-oxo Δ^5 -esteroides a partir de Δ^5 -esteroides. Adicionalmente, este processo revelou-se quimiosseletivo, sendo tolerado o grupo OH livre ligado ao C3 (Salvador 2005). De facto, na maioria dos processos descritos para a oxidação alílica é necessário proteger o grupo 3 β -hidroxilo, normalmente na forma de acetato ou benzoato - para evitar a oxidação deste grupo a uma C3-cetona (Parish, 2004). Assim, uma vez que se adquiriu comercialmente a DHEA, o acetato de pregnenolona e a diosgenina, efetuou-se a oxidação alílica dos primeiros com o referido sistema constituído por BiCl_3 /TBHP. A diosgenina foi oxidada por outro método uma vez que a sua cadeia lateral é parcialmente degradada nas condições reacionais do sistema BiCl_3 /TBHP provavelmente devido à acidez de Lewis do bismuto (Salvador 2005). Assim, selecionou-se um método baseado em cobre (CuBr) combinado com TBHP e com um

catalisador de transferência de fase [cloreto de tetraetilamônio (TEA)] (Arsenou, 2003a) para efetuar esta transformação na diosgenina - contudo, isso implicou a proteção do OH da diosgenina sob a forma de acetato, seguida de oxidação e da desproteção.

As reações de proteção e de hidrólise foram adaptadas da tese "Novos Esteroides Inibidores da Síntese de Androgênios" (Moreira, 2008). A formação do éster em C3 foi efetuada usando anidrido acético e DMAP como catalisador e a desproteção foi efetuada em condições alcalinas.

3.3.2.1 Acetilação da diosgenina (Moreira, 2008)

Dissolveu-se o substrato (1,0012g; $2,412 \times 10^{-3}$ mol) em tetrahidrofurano (THF) (20 mL), à temperatura ambiente num balão de fundo redondo de 50 mL. Seguidamente adicionou-se anidrido acético (0,25 mL) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (21,07 mg), deixando-se a mistura a reagir sob agitação magnética e à temperatura ambiente.

Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 1:3), verificou-se que esta estava completa ao fim de oito horas, tendo o substrato sido completamente consumido, obtendo-se uma mancha correspondente ao produto com Rf de 0,89. A mistura reacional foi concentrada num evaporador rotativo e posteriormente foi dissolvida em diclorometano (300 mL) e lavou-se a fase orgânica com solução aquosa de HCl a 10% (35 mL), com solução aquosa saturada de hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃) (35 mL) e com água (35 mL).

A fase orgânica final foi depois seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se o composto pretendido.

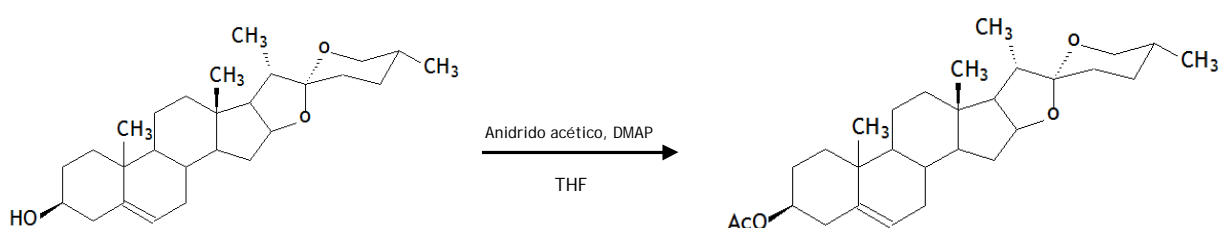


Figura 9 - Acetilação da diosgenina

3.3.2.2 Oxidação alílica do acetato de diosgenina (Arsenou, 2003a)

Dissolveu-se o produto proveniente da reação anterior em DCM (10 mL), à temperatura ambiente num balão de 50 mL de fundo redondo com agitação magnética. Seguidamente adicionou-se brometo de cobre (CuBr) (1,4 mmol; 200,83 mg), TEA (0,3 mmol; 55,119 mg) e TBHP (70%) (2,6 ml), deixando-se a mistura a reagir em refluxo e com agitação magnética. Adicionou-se 2,6 mL de TBHP (70%) uma hora e meia após o início da reação e novamente outros 2,6 mL três horas após o início da reação.

Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 2:1), verificou-se que esta estava completa ao fim de três horas e quarenta e cinco minutos, tendo o substrato sido praticamente todo consumido. Obteve-se uma mancha amarelada correspondente ao produto com absorção UV (254 nm) e com R_f de 0,68.

Após parar a reação, a mistura reacional foi concentrada e colocada sob agitação em contacto com 300 ml de uma solução aquosa de sulfito de sódio a 10% durante algumas horas. De seguida, extraiu-se a fase aquosa com éter dietílico (Et₂O) (3 x 75 mL) e lavou-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de NaHCO₃ (30 mL) e com 30 mL de água, secando-a posteriormente com Na₂SO₄ anidro e depois filtrou-se e evaporou-se à secura, obtendo-se 0,916 g de produto não purificado.

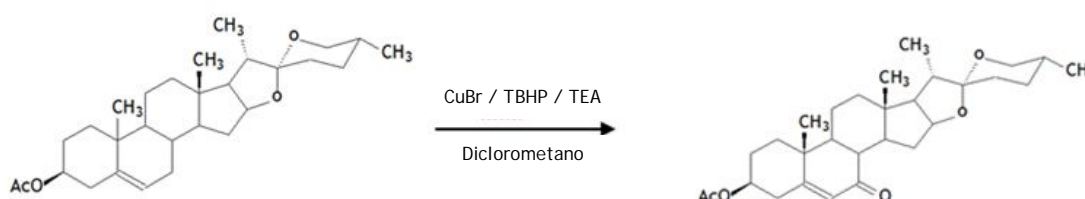


Figura 10 - Oxidação alílica do acetato de diosgenina

3.3.2.3 Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina (Moreira, 2008)

Dissolveu-se o crude proveniente da reação anterior (0,916 g) em 16,13 mL de metanol (MeOH) à temperatura ambiente num balão de fundo redondo de 50 mL sob agitação magnética. Seguidamente adicionou-se 5,376 mL de uma solução de KOH 10% em metanol, deixando-se a mistura a reagir sob agitação magnética e à temperatura ambiente.

Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 1:2), verificou-se que esta estava completa ao fim de uma hora e quarenta minutos, tendo o

substrato sido praticamente consumido. Obteve-se uma mancha amarelada correspondente ao produto com absorção no UV (254 nm) com Rf de 0,189.

Após parar a reação, a mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo. De seguida, num erlenmeyer, adicionou-se diclorometano (322 mL) e água (43 mL) e o produto e a mistura ficou sob agitação magnética durante duas horas. No final extraiu-se a fase aquosa com DCM (215 mL x 2) e lavou-se a fase orgânica total com água (43 mL), sendo seca com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada à securo, obtendo-se o composto que, depois de purificado por cromatografia em coluna (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 1:2) originou 0,206 g, correspondente a um rendimento dos três passos de 20,62%.

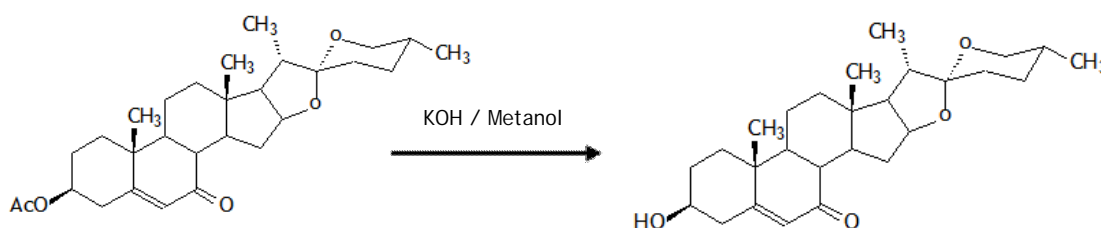


Figura 11 - Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxodiosgenina

O produto foi caracterizado conforme descrito acima e os dados espectrais obtidos correspondem ao descrito na literatura para este composto (González, 1971):

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0,763 (s, 3H, 18-H₃), 1,19 (s, 3H, 19-H₃), 3,65 (m, 1H, 3α-H), 5,67 (m, 1H, 6-H); ¹³C RMN (CDCl₃, 100 MHz): δ 66,80 (C26), 70,45 (C3), 80,95 (C16), 109,22 (C22), 125,90 (C6), 165,39 (C5), 201,72 (C7).

IV: 1240,41, 1632,48, 1670,38, 2927,46, 3030,20, 3498.48 cm⁻¹

3.3.2.4 Oxidação alílica da DHEA (Salvador, 2005)

Dissolveu-se o substrato (144,69 mg; 0,5 mmol) em acetonitrilo (3 mL), a uma temperatura de 70°C num balão de fundo redondo de 50 mL com agitação magnética. Seguidamente adicionou-se BiCl₃ (16 mg; 0,05 mmol) e TBHP (5.0-6.0M em *n*-decano; 0,9 mL; 5 mmol), deixando-se a mistura a reagir sob agitação magnética a 70°C.

Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 2:1), verificou-se que esta estava completa ao fim de vinte e quatro horas, tendo o substrato sido praticamente todo consumido e obteve-se uma mancha amarelada correspondente ao produto com absorção UV (254 nm) e com Rf de 0,68.

Num erlenmeyer, adicionou-se, ao produto da reação, solução aquosa de sulfito de sódio a 10% (120 mL) e éter dietílico (40 mL) e deixou-se durante algumas horas sob agitação magnética. De seguida, extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (40 mL x 3), e lavou-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de NaHCO_3 (40 mL) e com água (40 mL). A fase orgânica total foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada até à secura, obtendo-se 0,117 g de produto não purificado.

Após purificação por cromatografia em coluna (acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 3:1) obtiveram-se 0,065 g de produto purificado, correspondendo a um rendimento de 9,56%.

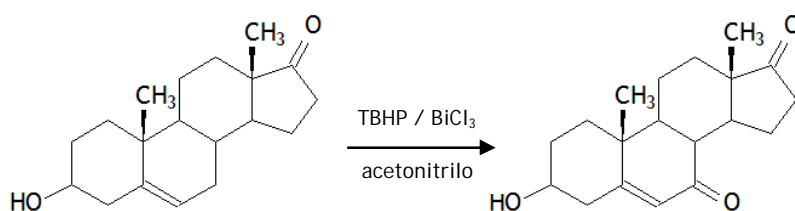


Figura 12 - Oxidação alílica da DHEA

O produto foi caracterizado conforme descrito acima e os dados espectrais obtidos correspondem ao descrito na literatura para este composto (Lardy, 1998):

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ 0,87 (s, 3H, 18- H_3), 1,20 (s, 3H, 19- H_3), 3,66 (m, 1H, 3 α -H), 5,71 (m, 1H, 6-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 75 MHz): δ 70,50 (C3), 126,11 (C6), 166,37 (C5), 201,27 (C7), 220, 60 (C17).

IV: 1299,10, 1620,92, 1649,55, 1719,55, 2968,63, 3020, 3478,04 cm^{-1}

3.3.2.5 Oxidação alílica do acetato de pregnenolona (Salvador, 2005)

Dissolveu-se o substrato (358,51 mg; 1 mmol) em acetonitrilo (6 mL), a uma temperatura de 70°C num balão de fundo redondo de 50 mL com agitação magnética. Seguidamente adicionou-se BiCl_3 (63,07 mg; 0,2 mmol) e TBHP (5.0-6.0M em *n*-decano; 1,8 mL; 1 mmol), deixando-se a mistura a reagir a 70°C e sob agitação magnética.

Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 2:1), verificou-se que esta estava completa ao fim de vinte e quatro horas, tendo o substrato sido praticamente todo consumido, obtendo-se uma mancha correspondente ao produto com absorção UV (254 nm) e com R_f de 0,68.

Num erlenmeyer, adicionou-se, ao produto da reação, solução aquosa de sulfito de sódio a 10% (150 mL) e éter dietílico (75 mL) e deixou-se durante algumas horas sob agitação

magnética. De seguida, extraiu-se a fase aquosa com acetato de etilo (75 mL x 3), e lavou-se a fase orgânica com solução aquosa saturada de NaHCO_3 (20 mL) e com água (20 mL). A fase orgânica total foi seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada até à secura, obtendo-se 0,341 g de produto não purificado.

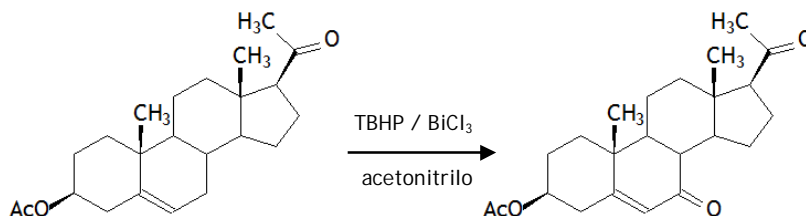


Figura 13 - Oxidação alílica do acetato de pregnenolona

3.3.2.6 Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxopregnenolona (Moreira, 2008)

Dissolveu-se o crude da reação anterior (0,3411 g; 0,9157 mmol) em MeOH (7,384 mL) à temperatura ambiente num balão de fundo redondo de 50 mL com agitação magnética. Seguidamente adicionou-se 2,461 mL de uma solução de KOH 10% em metanol, deixando-se a mistura a reagir sob agitação magnética e à temperatura ambiente.

Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 1:1), verificou-se que esta estava completa ao fim de vinte minutos, tendo o substrato sido consumido na totalidade, observando-se uma mancha alaranjada correspondente ao produto com absorção no UV (254 nm) e com R_f de 0,2.

Após parar a reação, a mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo. De seguida, num erlenmeyer, adicionou-se diclorometano (150 mL) e água (20 mL) ao produto e a mistura ficou sob agitação magnética durante duas horas. No fim, extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (100 mL x 2) e lavou-se a fase orgânica total com água (20 mL), sendo depois seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada à secura, e o produto resultante foi purificado por cromatografia em coluna (acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 2:1) obtendo-se 0,0226 g de composto puro, correspondente a um rendimento final dos dois passos reacionais de 8,10%.

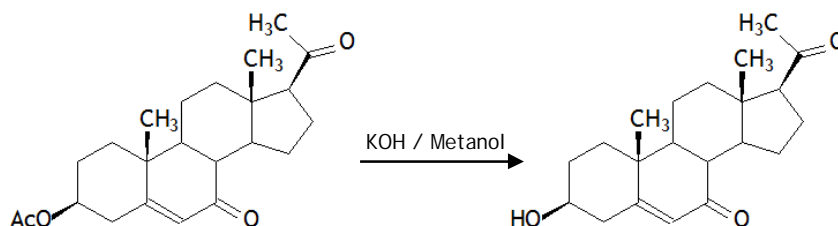


Figura 14 - Hidrólise alcalina do acetato de 7-oxopregnenolona

O produto foi caracterizado conforme descrito acima e os dados espectrais obtidos correspondem ao descrito na literatura para este composto (Li, 2010):

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,63 (s, 3H, 18- H_3), 1,18 (s, 3H, 19- H_3), 2,10 (s, 3H, 21- H_3), 3,65 (m, 1H, 3 α -H), 5,68 (m, 1H, 6-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ 70,41 (C3), 125,89 (C6), 165,52 (C5), 201,52 (C7), 209,76 (C20).

IV: 1246,74, 1627,83, 1654,35, 1702,87, 2948,46, 3032,41, 3447,49 cm^{-1}

3.3.2.7 Hidrólise alcalina do acetato de pregnenolona (Moreira, 2008)

Dissolveu-se o substrato (0,897 g; 0,25 mmol) em MeOH (2,016 mL) à temperatura ambiente num balão de 50 mL de fundo redondo com agitação magnética. Seguidamente adicionou-se 0,067 mL de uma solução de KOH em metanol a 10%, deixando-se a mistura a reagir sob agitação magnética e à temperatura ambiente. Ao controlar a reação por TLC (eluente: acetato de etilo - éter de petróleo 40-60°C 1:2), verificou-se que esta estava completa ao fim de seis horas e cinquenta minutos, tendo o substrato sido praticamente consumido na totalidade. Obteve-se uma mancha alaranjada correspondente ao produto, sem absorção UV (254 nm) e com Rf de 0,1875.

Após parar a reação, a mistura reacional foi concentrada no evaporador rotativo. De seguida, num erlenmeyer, adicionou-se diclorometano (26,88 mL) e água (5,376 mL) ao produto e a mistura ficou sob agitação magnética durante duas horas. No fim, extraiu-se a fase aquosa com diclorometano (40 mL x 3), lavou-se a fase orgânica total com água (5,4 mL), sendo seca com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada à secura, obtendo-se 0,0226 g de produto, correspondente a um rendimento de 25,21%.

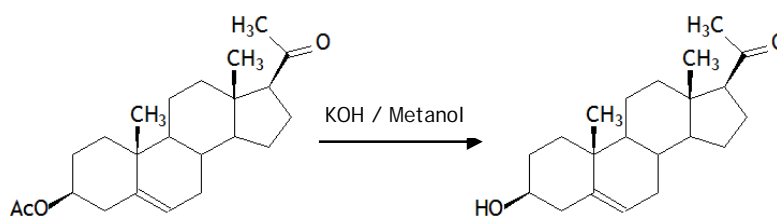


Figura 15 - Hidrólise alcalina do acetato de pregnenolona

O produto foi caracterizado conforme descrito acima e os dados espectrais obtidos correspondem ao descrito na literatura para este composto (Szendi, 1995):

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0.613 (s, 3H, 18- H_3), 0,989 (s, 3H, 19- H_3), 2.102 (s, 3H, 21- H_3), 3.50 (m, 1H, 3 α -H), 5.33 (d, 1H, 6-H); ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100 MHz): δ 71.72 (C3), 140.77 (C5), 121.2 (C6), 209.55 (C20).

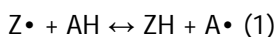
IV (cm^{-1}): 1050, 1271, 1358, 1436, 1681, 2929, 3502 cm^{-1}

3.3.3 Ensaio colorimétrico para determinação da capacidade antioxidante - Ensaio do DPPH

Considera-se um antioxidante qualquer substância capaz de neutralizar os efeitos da oxidação provocada por radicais livres nos tecidos animais. Um antioxidante eficaz é aquele que consegue ter uma capacidade *scavenger* de radicais de tal ordem que consegue parar a reação em cadeia de formação de radicais livres (Huang, 2005).

O radical livre DPPH [α,α -difeníl- β -picrilhidrazil, ou 2,2-difeníl-1-picrilhidrazil (Kedare, 2011)] foi descoberto em 1922 por Goldschmidt e Benn na reação de oxidação de hidroquinona a benzoquinona (Ionita, 2005); é um radical relativamente estável, não dimerizando (Molyneux, 2004). Este radical é relativamente estável porque o seu eletrão desemparelhado sofre uma deslocalização por toda a molécula (Ionita, 2005). O DPPH é, porém, sensível à luz, ao oxigénio, ao pH e ao solvente (Scherer, 2009), sendo insolúvel em água (Ionita, 2005). Tem uma cor violeta intensa semelhante ao KMnO_4 e quando é reduzido a sua cor passa a ser amarelada (Ionita, 2005). O eletrão do átomo de azoto do DPPH é reduzido ao reagir com o antioxidante (Scherer, 2009) num processo redox transformando-se na correspondente hidrazina (Kedare, 2011).

Representando o radical DPPH por $\text{Z}\cdot$ e a molécula dadora por AH, a reação primária é:



sendo ZH a forma reduzida e $\text{A}\cdot$ o radical produzido.

O método do DPPH é amplamente utilizado (Scherer, 2009) devido à facilidade em se seguir a reação pela mudança de cor e a correspondente mudança do comprimento de onda no espectro visível - de 520 nm para 330nm (Ionita, 2005), sendo que o grau de mudança na coloração é proporcional à concentração de antioxidante (Huang, 2005).

O método original foi desenvolvido por Marsden Blois em 1958, utilizando como modelo antioxidante o aminoácido cisteína. O método mais recente, de Brand-Williams e colegas, - o utilizado neste trabalho - tem sido utilizado como referência por vários grupos de

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

investigadores (Molyneux, 2004). Estes autores introduziram como parâmetro o valor de EC_{50} - concentração eficiente -, ou seja, a concentração que reduz a atividade do DPPH em 50%. Esta EC_{50} consiste num dos parâmetros que se pretende determinar neste trabalho; o outro parâmetro a determinar para cada um dos compostos ao longo do estudo cinético é a percentagem de DPPH remanescente que é calculada por:

$$\%DPPH_{rem} = 100 \times \frac{[DPPH]_{rem}}{[DPPH]_{T=0}} \quad (2)$$

A percentagem de DPPH remanescente é proporcional à concentração de antioxidantes existentes no meio reacional (Huang, 2005).

Tentou-se avaliar todos os compostos sintetizados, bem como os seus compostos-mãe, neste teste.

A preparação da solução de DPPH foi primeiramente efetuada como descrito no método de Brand-Williams - método referência para realização de ensaios com DPPH - (Brand-Williams, 1994), obtendo-se como valor de absorvância 0,620.

A solução de DPPH pode ser preparada quer em metanol quer em etanol, pois nenhum dos dois solventes interfere na reação (Molyneux, 2004). Neste caso utilizou-se o metanol para os derivados androstanos e pregnanos. A solubilidade da diosgenina em metanol é reduzida e por isso tentou-se então realizar o ensaio em etanol puro para este composto, mas também não foi possível realizar este ensaio com este composto.

Após leitura de vários artigos, verificou-se que os valores mais comuns de comprimento de onda que se utilizavam para este tipo de ensaios eram 515 ou 517 nm (Huang, 2005; Magalhães, 2008; Gaši, 2011; Choudhary, 2005; Djeridane, 2010; Minorics, 2011). Após os primeiros ensaios segundo o método de Brand-Williams (que utiliza para medição da absorvância o valor de 515 nm), obteve-se uma correlação das retas de calibração melhor a 515 nm do que a 517 nm, decidindo-se utilizar este valor para todos os ensaios.

Como padrão para testar o método utilizou-se o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), um derivado da vitamina E, composto bastante utilizado neste tipo de ensaios, sendo que uma das formas de comparar a atividade antioxidante de diversos compostos é fazê-lo em termos de equivalentes de trolox (Huang, 2005; Lin, 2012; Dincer, 2012).

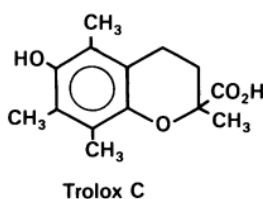


Figura 16 - Molécula de trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico)

A partir da reta de regressão linear obtida da curva a diferentes concentrações, calculou-se a concentração para a qual se obtinha uma absorvância próxima do valor numérico um (Kedare, 2011) a 515 nm, preparando-se posteriormente uma solução stock de DPPH para cada ensaio efetuado que foi conservada no frigorífico protegida da luz com papel de alumínio.

O estradiol foi também utilizado como comparação para os esteroides modificados a serem testados, pois a sua atividade antioxidante é já conhecida.

Todos os tubos de ensaio contendo a solução mistura do composto com o DPPH foram revestidos com papel de alumínio para a luz não interferir com a experiência.

Assim, a cada 2,7 mL da solução de DPPH com uma concentração de 40 µg/mL adicionou-se 0,3 mL de cada solução de composto com concentração diferente, deixando-se a mistura reagir no escuro e à temperatura ambiente durante cinco horas e meia. Efetuaram-se medições aos 30, 45, 75, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300 e 330 minutos, tendo como objetivo fazer um estudo cinético de cada composto (estradiol, DHEA, 7-oxoDHEA, pregnenolona, 7-oxopregnenolona, diosgenina e 7-oxodiosgenina) para tentar prever o comportamento antioxidante ao longo do tempo.

3.3.4 Ensaios em linhas celulares

3.3.4.1 Descrição das linhas celulares utilizadas nos ensaios e sua cultura

As células utilizadas nestes ensaios foram adquiridas à empresa ATCC, estando criopreservadas em azoto líquido.

As células NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) são obtidas da derme de adultos e são células que não estão completamente diferenciadas ou especializadas.

Estas células foram cultivadas em caixas de 75 cm³, com meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (FBS, Biochrom AG, Portugal), 1mM de piruvato de sódio (Sigma Aldrich, Portugal), 10mM de HEPES (Sigma Aldrich, Portugal), 20mM de L-glutamina (Sigma Aldrich, Portugal) e 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B). Foram mantidas na estufa (Bioblock Scientific) a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Substituiu-se o meio de cultura a cada dois a três dias. Nos ensaios, as células foram utilizadas na passagem 8.

As células MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) são uma linha celular que foi isolada pela primeira vez em 1970 proveniente de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos a quem tinha sido diagnosticado adenocarcinoma mamário metastático. Esta linhagem reteve várias características do epitélio mamário diferenciado, tal como recetores citoplasmáticos de estrogénios e de progesterona.

A oxidação de esteroides no desenvolvimento de potenciais agentes antioxidantes e antitumorais

Estas células foram cultivadas em caixas de 75 cm³, com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) e 1% de antibiótico/antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina, 10mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina B).

Foram mantidas na estufa (Bioblock Scientific) a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Substituiu-se o meio de cultura a cada dois dias. Nos ensaios, as células foram utilizadas na passagem 36.

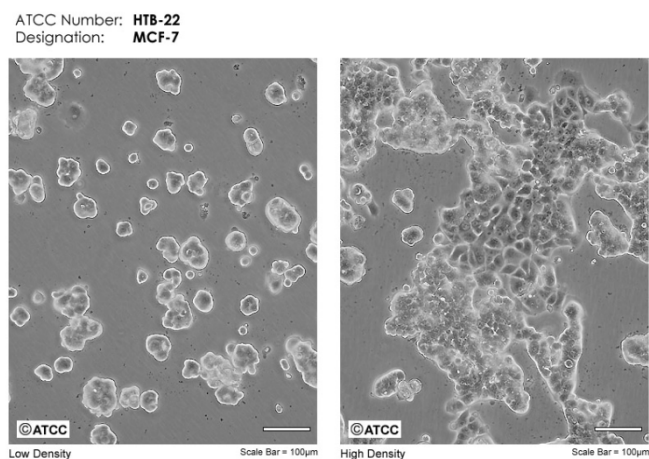


Figura 17 - Células MCF-7 (www.lgcstandards.com)

As células LNCaP (*Lymph node carcinoma of the prostate*) são uma linha celular do adenocarcinoma da próstata sensível a androgénios, originárias do nódulo linfático supraclavicular esquerdo de um homem caucasiano com 50 anos. São células epiteliais com características aderentes e responsivas à 5α-dihidrotestosterona.

Estas células foram cultivadas em caixas de 75 cm³, com meio RPMI (Sigma Aldrich, Portugal) suplementado com 10% de FBS (Biochrom AG, Portugal) e 1% de antibiótico (10,000 unidades/ml de penicilina e 10 mg/ml de estreptomicina) e foram mantidas na estufa (Bioblock Scientific, Sigma Aldrich, Portugal) a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Substituiu-se o meio de cultura a cada dois a três dias. Nos ensaios, as células foram utilizadas na passagem 21.

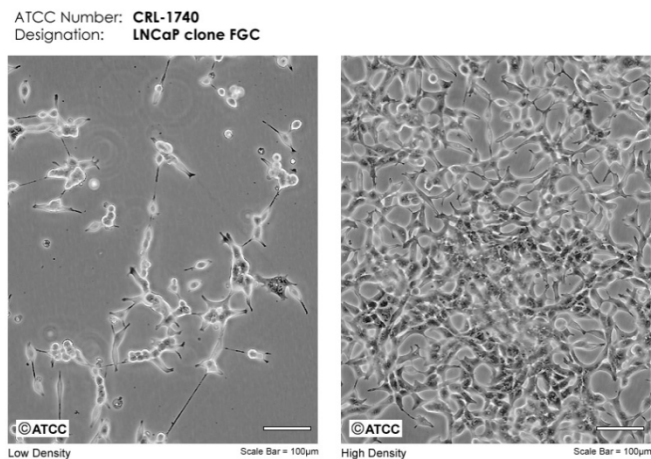


Figura 18 - Células LNCaP (www.lgcstandards.com)

3.3.4.2 Tripsinização, contagem e sementeira das células

Quando as células nas caixas de cultura estavam quase confluentes [observação ao microscópio (Olympus CK 40)], ou foram expandidas para mais frascos de cultura ou utilizadas para a experiências de avaliação dos efeitos dos compostos na sua proliferação. Ambos estes processos são efetuados através da tripsinização, que permite que as células aderentes ao fundo das caixas se soltem para poderem ser trabalhadas. Para isso, aspirou-se, sob vácuo, o meio de cultura existente no frasco, seguido da lavagem das células com tampão fosfato salino (10 mL de tampão numa caixa de 75 mL). Após aspirar o tampão, adicionou-se um volume igual de tripsina (0,025% em tampão fosfato salino/EDTA; Sigma Aldrich, Portugal) para que as células existentes se soltem do fundo da caixa e os frascos foram novamente colocados na estufa (Bioblock Scientific, Sigma Aldrich, Portugal) a uma temperatura de 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂ durante cinco minutos.

Após se verificar ao microscópio que as células já não se encontravam aderentes, neutralizou-se a tripsina com meio de cultura suplementado com soro fetal bovino e centrifugou-se a suspensão resultante durante oito minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso com meio de cultura. Nesta fase, pode efetuar-se a contagem das células para calcular a sua concentração. Quando se pretendeu expandir as células, a suspensão celular foi semeada novamente em novos frascos de cultura; quando se pretendeu realizar o estudo da avaliação dos efeitos dos compostos na sua proliferação foi preparado o volume pretendido com a concentração adequada de células para semear em caixas *multiwells*.

Para efetuar a contagem, o *pellet* resultante da tripsinização foi ressuspenso em meio de cultura completo adequado a cada linha celular, do qual se retiraram 10 µL para um tubo eppendorf ao qual se adicionou um volume igual de solução de azul de triptano 0,4% (Merck, Alemanha). Colocou-se a suspensão resultante sob uma lamela numa câmara de *Neubauer* para se contabilizar ao microscópio o número de células existente em cada quadrante. Após a contagem das células, calculou-se a média de células existente por quadrante e duplicou-se o valor obtido (devido à diluição provocada pela adição da solução de azul de triptano), obtendo-se através da fórmula de Neubauer a concentração de células na suspensão celular obtida. A partir deste valor preparou-se, por diluição, o volume pretendido com a concentração adequada de células para semear em caixas *multiwells* e fez-se a sementeira.

3.3.4.3 Avaliação da actividade proliferativa/antiproliferativa dos compostos em estudo - Ensaio do MTT

As soluções dos compostos a estudar nas células foram preparadas dissolvendo 0,01 mol de cada composto num mililitro de etanol absoluto. A partir desta solução mãe foram preparadas diluições sucessivas nos meios de cultura, de modo a obter as concentrações utilizadas nas células: 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M e 100 μ M. A concentração de etanol não foi superior 1% (nesta concentração não tem efeitos na viabilidade celular).

No ensaio celular, estudaram-se vários compostos simultaneamente; para tal, prepararam-se placas *multiwells* de 24 *wells*, estudando-se um composto por caixa.

Assim, em cada *well* foram colocados 500 μ l da suspensão celular numa concentração de 2×10^4 células/mL no meio de cultura apropriado, incubando-se as caixas durante 48h antes de se iniciar a experiência propriamente dita. Após esta incubação, a cada *well* adicionou-se meio com a concentração de composto pretendida aspirando-se previamente o meio existente. Os compostos estiveram em contacto com as células durante 72 horas. Após este tempo de exposição, foram imediatamente sujeitas ao ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio - Sigma Aldrich, Portugal) explanado posteriormente.

Cada concentração de cada composto foi testada em triplicado. Em cada placa existiram também três *wells* que funcionaram como controlo e três *wells* que funcionaram como zero, como se pode ver na figura abaixo:

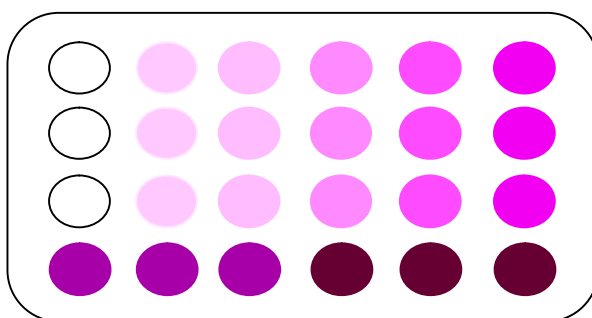


Figura 19 - Representação de uma placa de 24 *wells* e de como foram distribuídas as concentrações, os controlos e os zeros. ● Controlo; Zero; ● 0,01mM; ● 0,1mM; ● 1mM; ● 10mM; ● 50mM; ● 100mM.

O controlo continha apenas meio de cultura e a média obtida da absorvância destes três *wells* foi considerada como sendo 100% de viabilidade celular; todos os outros valores foram considerados em relação ao controlo.

O teste do MTT [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazólio] tem sido utilizado em todo o mundo, sendo um método sensível para testar compostos potencialmente anticancerígenos; é útil para medir a citotoxicidade *in vitro* e a proliferação celular. É um teste preciso, sensível, conveniente, rápido e económico, que depende do número de células

presentes e da atividade mitocondrial por célula; a sensibilidade depende também do tipo de linhagem celular.

Este teste fundamenta-se no facto da enzima mitocondrial succinato desidrogenase ser capaz de clivar o sal de tetrazólio solúvel em água na zona do anel de tetrazólio e transformá-lo num produto insolúvel de coloração azul-arroxeadada (formazano) que é impermeável às membranas celulares (Fotakis, 2006); assim, a quantidade de formazano produzida é proporcional à quantidade de células viáveis (Wan, 1994), pois os cristais acumulam-se nas células vivas (Fotakis, 2006).

Os cristais são habitualmente solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO) após se aspirar o sobrenadante e efetua-se uma leitura espectrofotométrica a 570 nm.

O ensaio tem de ser realizado sem luz porque o MTT, tal como o DPPH, é sensível à mesma.

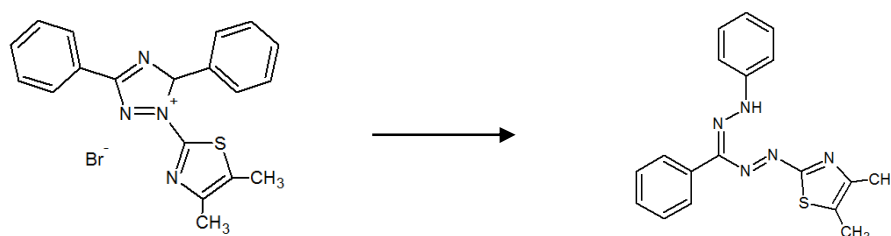


Figura 20 - Molécula do MTT [brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazólio] e respetiva clivagem pela enzima succinato desidrogenase

No dia em que se realizou o ensaio, colocaram-se 500 μ L de uma solução contendo o meio respetivo incompleto (sem soro fetal bovino) e o MTT na concentração de 5 mg/mL, em cada *well*. Após a adição desta solução de MTT às células, as placas foram embrulhadas em papel de alumínio e colocadas na estufa incubadora (Bioblock Scientific) durante quatro horas, a 37°C. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado e dissolveram-se os cristais de formazano por adição de 400 μ L de DMSO em cada *well*; adicionou-se também 50 μ L de tampão glicina em cada *well* e foi imediatamente lida a absorvância a 570 nm.

3.3.5 Análise estatística

Para comparar os resultados obtidos nas células, recorreu-se a uma análise estatística. Os resultados gráficos de citotoxicidade foram expressos como valores médios \pm desvio padrão. A comparação entre múltiplos grupos foi analisada pelo teste *t*-student para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. A diferença entre grupos foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$. Os valores de IC₅₀ respeitantes à acção antiproliferativa dos compostos foram calculados a partir da curva dose-resposta por cálculos de ajustamento sigmoide utilizando-se as seis concentrações diferentes de cada composto.

3.4 Resultados obtidos e discussão

Após se obterem os valores de absorvância, fez-se a diferença entre estes e o valor original; posteriormente calculou-se a concentração e a percentagem de DPPH remanescente. Com este valor de DPPH remanescente fez-se uma comparação entre compostos a três diferentes concentrações ao fim de 30 e de 330 minutos de mistura, resultados esses que se apresentam na Tabela 5 e que estão de acordo com Huang, que refere que as cinéticas de reação entre o DPPH e os antioxidantes não são lineares em relação às concentrações de DPPH (Huang, 2005).

Tabela 5 - Comparação de valores de DPPH remanescente para os diferentes compostos em estudo aos 30 e 330 min

Composto	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	% DPPH remanescente aos 30 min	% DPPH remanescente aos 330 min
Estradiol	1	96,65	93,69
	750	93,69	79,25
	5000	80,88	55,83
DHEA	1	97,44	95,39
	750	97,34	91,70
	5000	97,03	81,45
7-oxo DHEA	1	91,80	92,73
	750	93,55	89,14
	5000	91,80	86,99
Pregnenolona	1	88,71	85,34
	750	88,07	84,25
	5000	86,07	80,06
7-oxopregnenolona	1	99,91	96,48
	750	99,67	95,76
	5000	97,66	91,15
Diosgenina	1	Não se conseguiram valores lineares	
	750	Não se conseguiram valores lineares	
	5000	Não se conseguiram valores lineares	

Com a diosgenina, não se conseguiu obter um decréscimo linear na absorção espectrofotométrica no ensaio do DPPH, provavelmente devido à solubilidade insuficiente do composto em metanol e em etanol. Mesmo na concentração de $1 \mu\text{g/mL}$, ao observar a solução ao microscópio, existiam partículas que podiam perturbar a leitura no espectrofotómetro, o que se veio a confirmar nos valores não lineares na absorção.

No método de DPPH tem de se ter em conta que os valores obtidos só são válidos para estas condições experimentais; para outros volumes relativos de solução de DPPH e de solução de composto a estudar os resultados obtidos poderiam ser um pouco diferentes. Este método encontra-se condicionado devido ao facto do radical interagir com outros radicais e ser sensível a algumas bases de Lewis, a alguns solventes e ao oxigénio. (Kedare, 2011) Existem até relatos de a reação poder ser reversível para determinados compostos como o eugenol (Huang, 2005).

Com estes valores calculou-se a EC₅₀ para o estradiol e para o trolox através da equação da reta obtida para cada um dos compostos no gráfico % de DPPH remanescente vs concentração do composto em estudo. Para cada composto, tentou-se ver quais seriam as concentrações em que o gráfico estivesse mais linear e onde se obtivesse um melhor coeficiente de correlação. A título de exemplo, mostra-se os cálculos para a EC₅₀ do trolox ao fim de 30 minutos:

$$y = -0,8159x + 85,868 \Leftrightarrow 50 = -0,8159x + 85,868 \Leftrightarrow x = 43,961 \mu\text{g/mL} \quad (3)$$

Abaixo, na Tabela 6, são apresentados os valores obtidos para cada composto aos 30 e aos 330 minutos relativamente à sua EC₅₀:

Tabela 6 - Comparação da EC₅₀ dos diferentes compostos em estudo aos 30 e 330 min

Composto	EC ₅₀ aos 30 min	EC ₅₀ aos 330 min
Estradiol	ND	5714,20 µg/mL
Trolox	43,96 µg/mL	40,74 µg/mL
DHEA		ND
7-oxo DHEA		ND
Pregnenolona		ND
7-oxopregnenolona		ND

ND - não determinado

Como se pode verificar, só se pôde calcular a EC₅₀ para o estradiol e para o trolox porque foram os dois únicos compostos que conseguiram diminuir a percentagem de DPPH remanescente para valores da ordem dos 50%.

Os valores de absorvância do estradiol começaram a estabilizar após cinco horas e meia do início do estudo na concentração mais elevada; não sendo este continuado por mais tempo por ausência de uma das concentrações devido a perdas durante o mesmo.

Embora os valores de absorvância da DHEA tenham começado a estabilizar mais cedo, por uma questão de coerência, o estudo foi realizado à mesma durante cinco horas e meia. Também por uma questão de coerência, todos os outros compostos foram estudados durante cinco horas e meia.

De acordo com Brand-Williams, ao fazer-se este tipo de análise, deve-se ter o cuidado de ressaltar que nem todas as substâncias têm a mesma cinética de reação, devendo-se, para uma boa comparação, fazer o estudo cinético de cada uma delas; os valores obtidos podem ser devidos à estrutura da molécula ou à sua cinética de reação (Brand-Williams, 1994).

Todos os dias foi feita nova curva de calibração, devido ao facto de se estar a trabalhar com uma solução contendo um radical, que, embora esteja protegido da luz e no frio, reage consigo próprio.

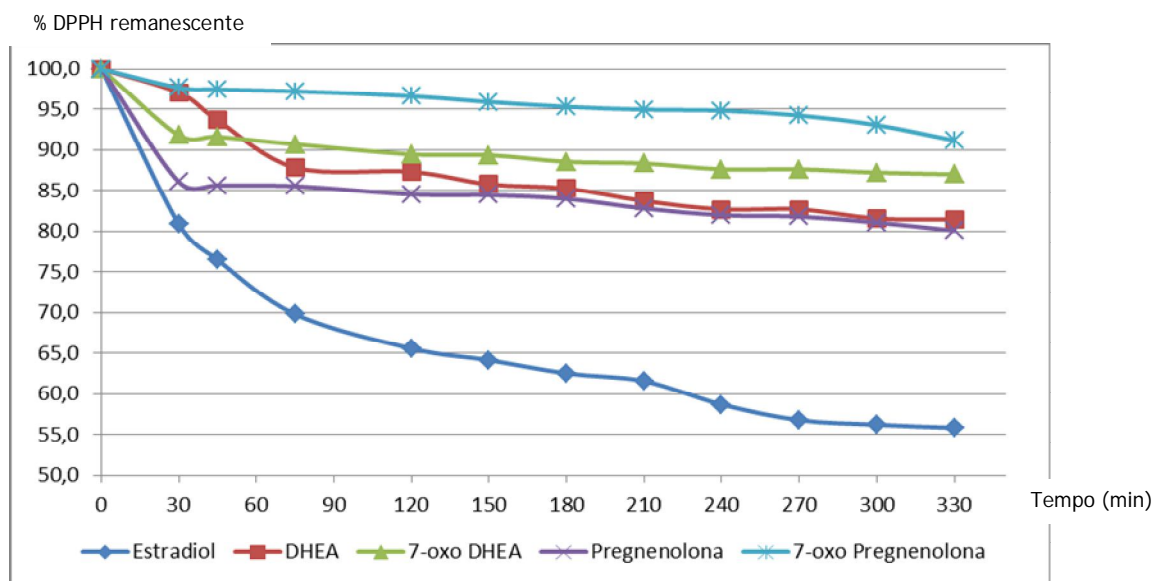


Figura 21 - Estudo cinético comparativo de todos os compostos na concentração de 5000 µg/mL

Analisando a figura 21, verifica-se que mesmo a elevadas concentrações (5000 µg/mL) os compostos não mostraram capacidade antioxidante marcada. O composto que mostrou maior capacidade antioxidante foi o trolox, que neste estudo serviu de padrão, como anteriormente referido.

Nenhum dos compostos sintetizados conseguiu baixar a percentagem de DPPH remanescente para valores inferiores a 50%, tendo sido obtido o melhor resultado com a pregnenolona (80,061%).

Os compostos 7-oxo apresentam menor capacidade antioxidante. Embora se compararmos a cinética de reação da DHEA com a 7-oxo DHEA, esta última, nos primeiros 45 minutos do ensaio consegue uma redução da percentagem de DPPH remanescente maior. Conclui-se então que é importante deixar a reação atingir o seu plateau para uma correta interpretação dos dados entre compostos (Brand-Williams, 1994) e que uma comparação efetuada aos 30 minutos de reação pode não ser a mais correta. Os resultados após 90 minutos podem ser explicados pela potencial formação de um radical centrado no C7 dos Δ^5 -esteroides DHEA e pregnenolona, e que já não pode ser formado nos derivados 7-oxidados. Este radical é estabilizado por ressonância com a dupla ligação C5=C6, e não se deverá formar em C4 por motivos de estabilidade. Esta situação também se poderá equacionar para a diosgenina e para a 7-oxidiosgenina, porém, como anteriormente referido, não foi possível realizar o ensaio com estes compostos (Arsenou, 2003a).

De seguida são apresentados os resultados obtidos nos ensaios de avaliação dos efeitos destes compostos na proliferação das células NHDF, MCF-7 e LNCaP nas Figuras 22-33.

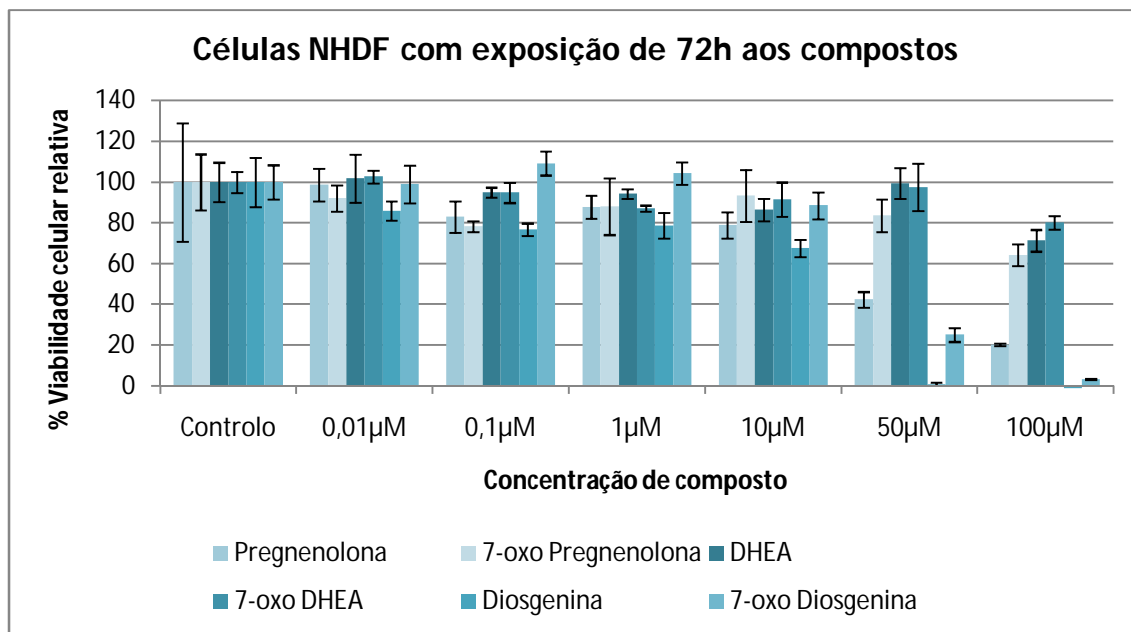


Figura 22 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas a cada um dos compostos em estudo em determinada concentração;

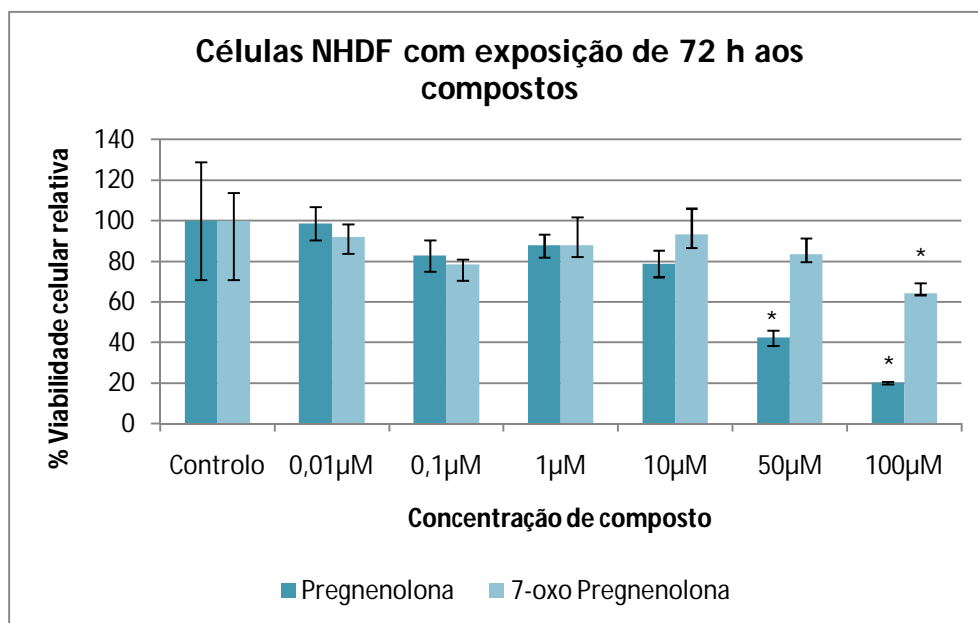


Figura 23- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas à pregnenolona e à 7-oxopregnenolona nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste t de Student)

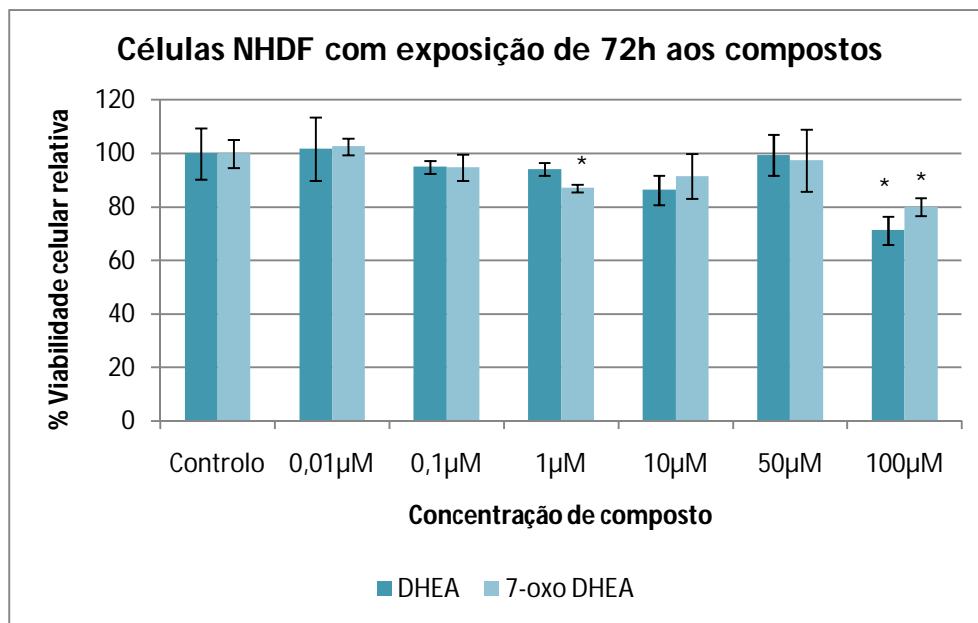


Figura 24 - Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas ao DHEA e ao 7-oxo DHEA nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste *t* de Student)

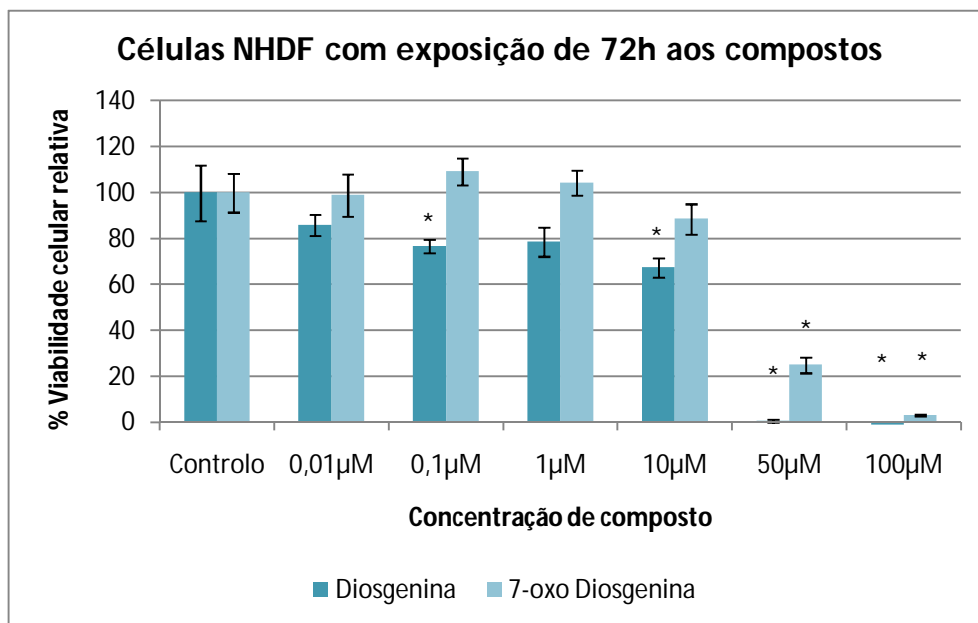


Figura 25- Efeito na viabilidade celular nas células NHDF após exposição de 72 horas à diosgenina e à 7-oxodiosgenina nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste *t* de Student)

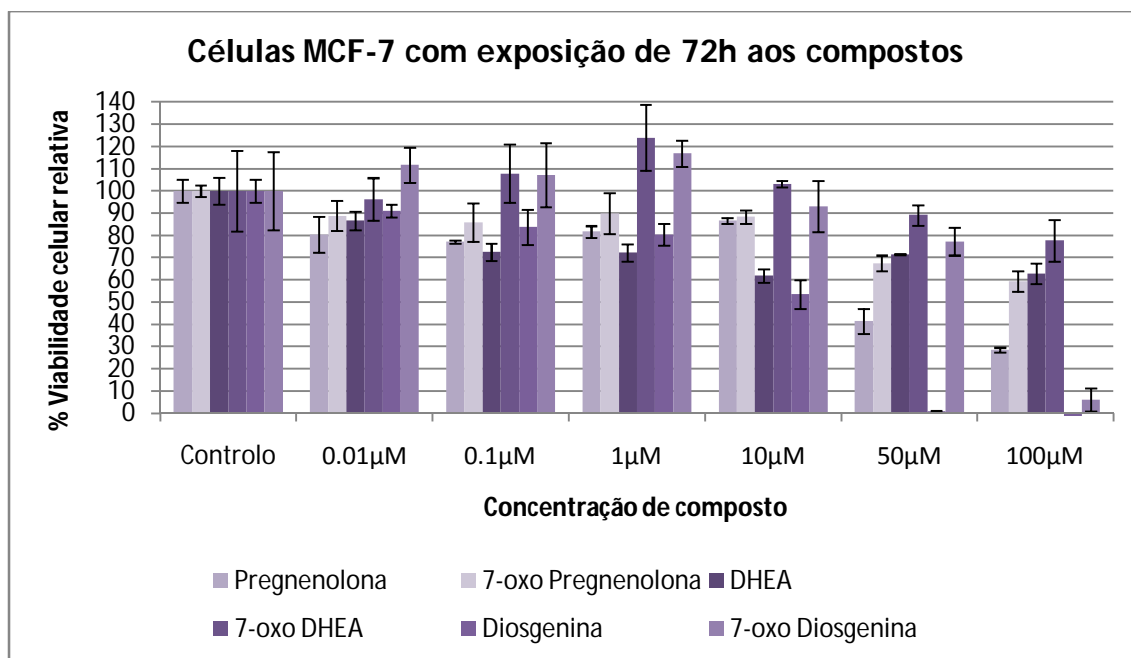


Figura 26 - Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas a cada um dos compostos em estudo em determinada concentração

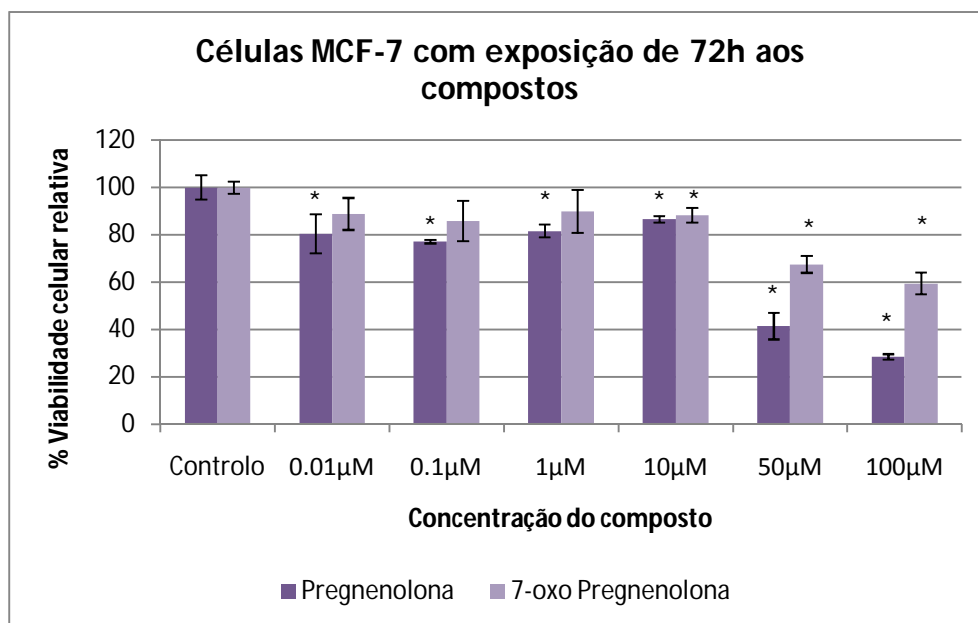


Figura 27 - Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas à pregnenolona e à 7-oxopregnenolona nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste t de Student)

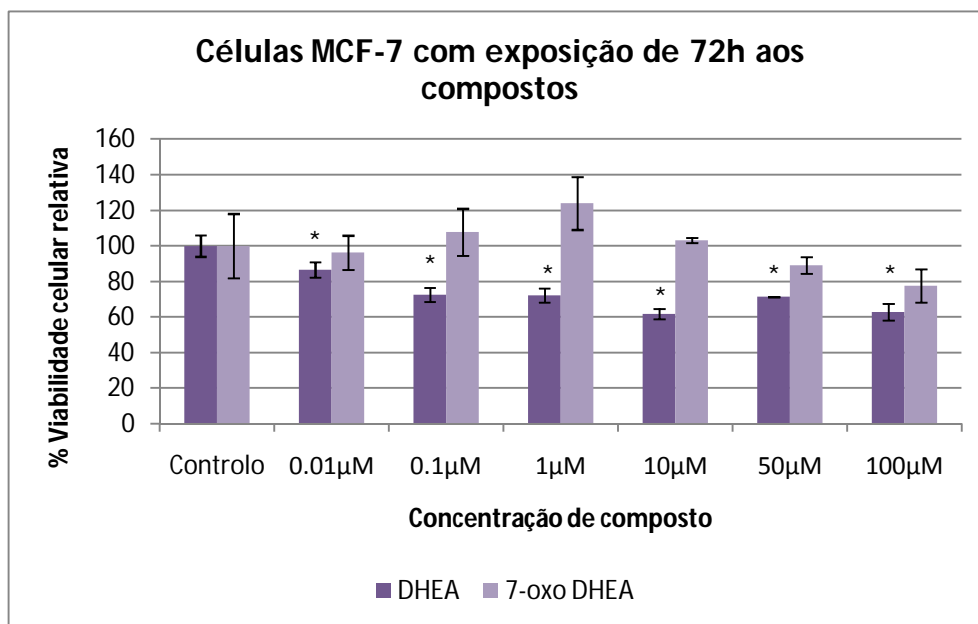


Figura 28 - Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas ao DHEA e ao 7-oxo DHEA nas diferentes concentrações; * $p < 0,05$ em relação ao controlo (teste t de Student)

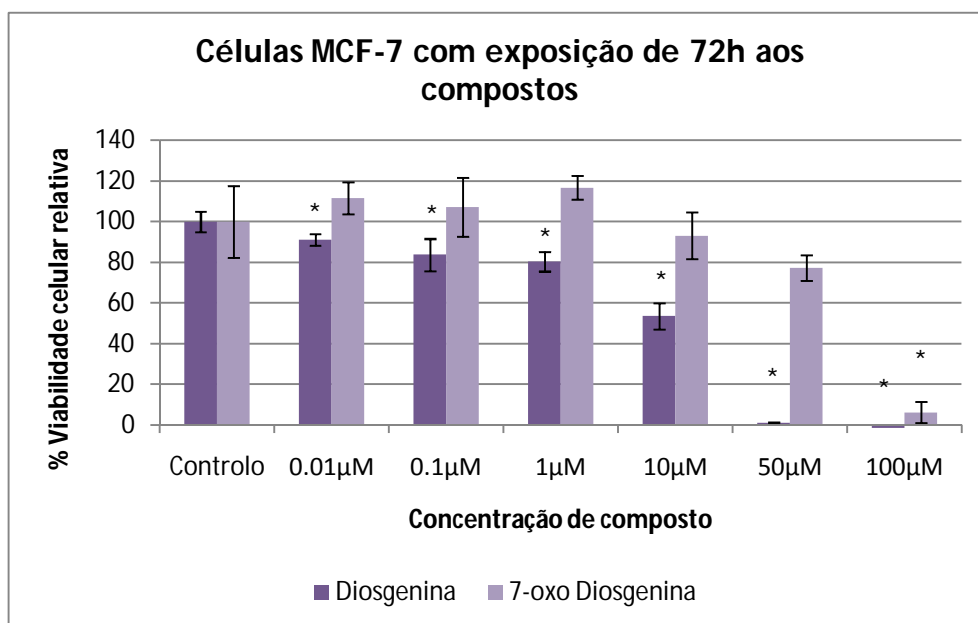


Figura 29 - Efeito na viabilidade celular nas células MCF-7 após exposição de 72 horas à diosgenina e à 7-oxodiosgenina nas diferentes concentrações; * $p < 0,05$ em relação ao controlo (teste t de Student)

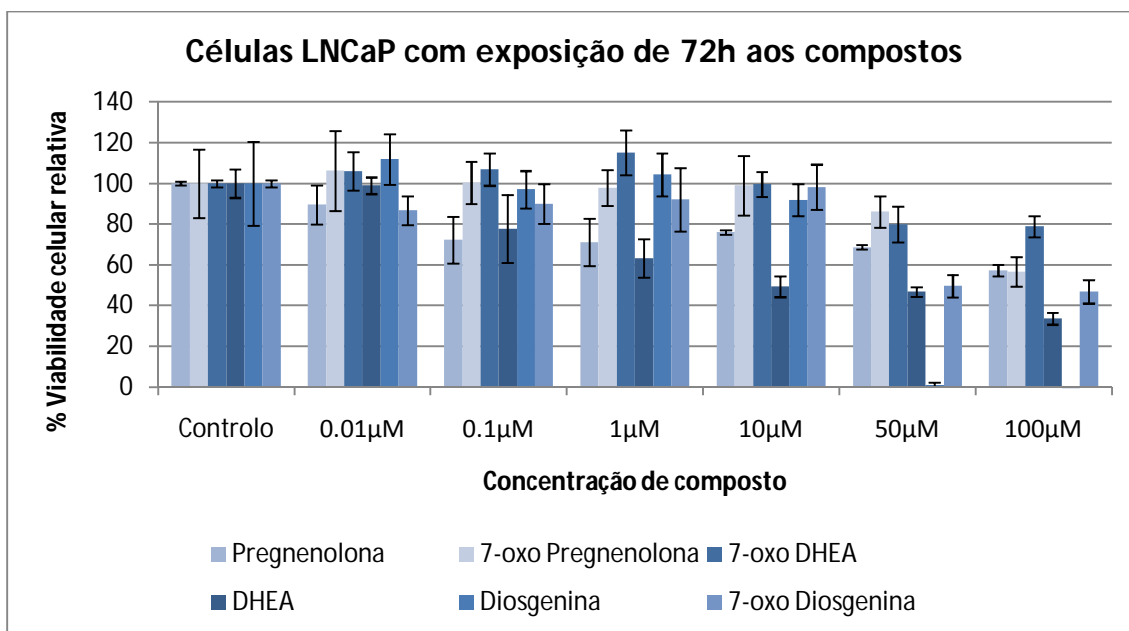


Figura 30 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas a cada um dos compostos em estudo em determinada concentração

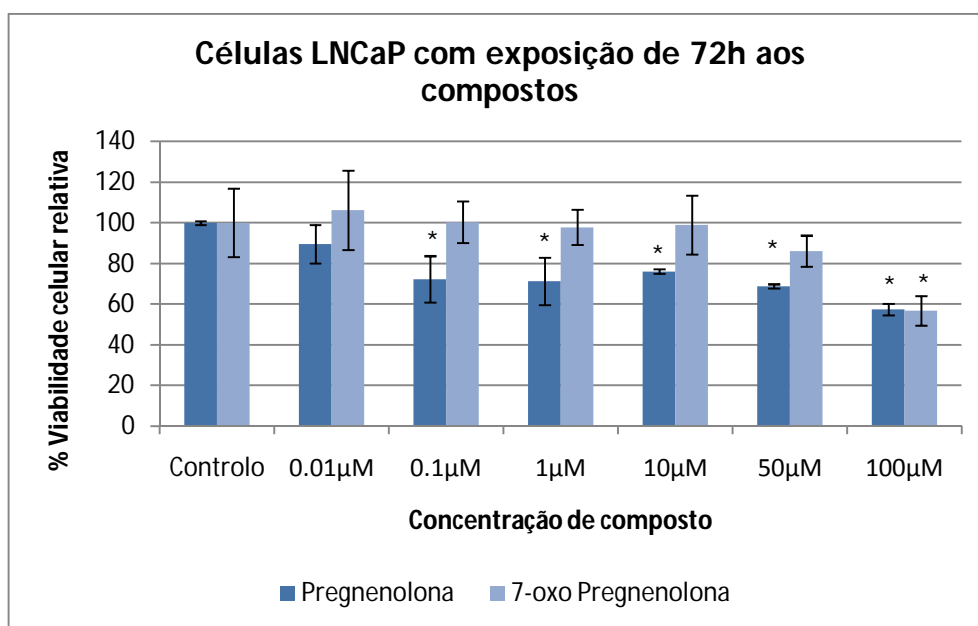


Figura 31 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas à pregnenolona e à 7-oxopregnenolona nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste *t* de Student)

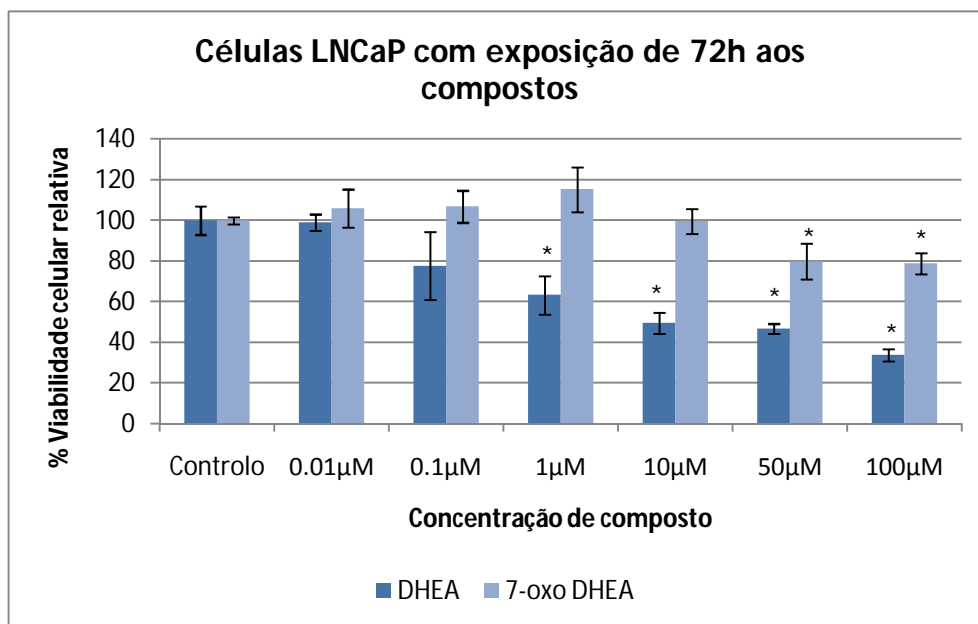


Figura 32 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas ao DHEA e ao 7-oxo DHEA nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste *t* de Student)

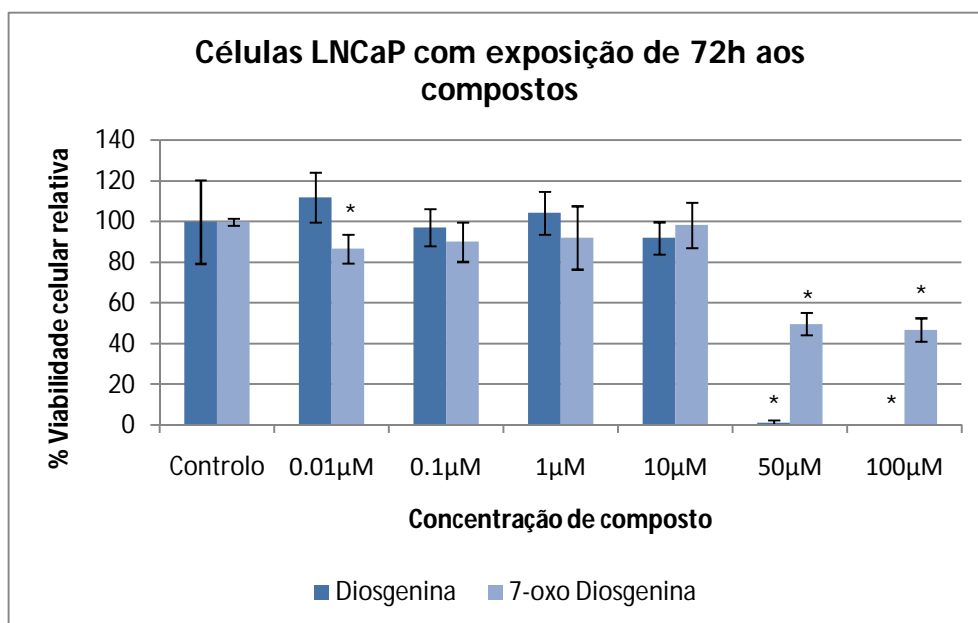


Figura 33 - Efeito na viabilidade celular nas células LNCaP após exposição de 72 horas à diosgenina e à 7-oxodiosgenina nas diferentes concentrações; *p < 0,05 em relação ao controlo (teste *t* de Student)

Da análise destes dados, nos três tipos de linhas celulares, as concentrações que tiveram maior efeito na viabilidade celular relativa foram as de 50 µM e as de 100 µM, como esperado. O composto que teve maior efeito na viabilidade celular das três linhas celulares foi a diosgenina e o seu 7-oxoderivado. Nas células MCF-7 foi onde parece ter existido uma maior

diminuição global na viabilidade celular relativa com estes compostos. De destacar ainda que as células NHDF, não-cancerígenas, parecem ser afetadas de modo similar ao observado nas células cancerígenas.

Como referido acima, foi observado que a introdução do grupo 7-oxo aumentou significativamente a atividade antileucémica de androstanos conjugados com clorambucilo em comparação com os correspondentes análogos não oxidados. Esta informação levou-nos a equacionar também se a introdução do grupo 7-cetona teria efeito similar nas células cancerígenas MCF-7 e LNCaP. Contudo, observou-se que, nas três séries de esteroides, a introdução deste carbonilo parece ter conferido alguma proteção às células nestes ensaios em comparação com os compostos-mãe. Os resultados obtidos estão, contudo, de acordo com os obtidos por Yoshida (2003) em células hepáticas (HepG2) e intestinais (Caco-2), em que a DHEA se revelou mais tóxica para as células do que a 7-oxoDHEA.

Por outro lado, uma vez que nas células uma parte significativa da DHEA e da pregnenolona pode ser metabolizada a hormonas esteroides, poder-se-á equacionar se esta metabolização poderá contribuir para um aumento da viabilidade celular em concentrações mais baixas e diminuí-la em concentrações mais elevadas (com a produção significativa de hormonas sexuais esteroides). Esta situação, teoricamente não deverá ocorrer para os 7-oxoderivados, pois estes já não podem ser metabolizados a hormonas sexuais (Kihel, 2011; Arsenou, 2003b). Porém, observa-se, nos três tipos de células que a 7-oxoDHEA parece levar a um aumento da proliferação celular nas concentrações intermédias, embora sem significado estatístico.

A diosgenina e provavelmente o seu 7-oxoderivado também não são biotransformados no organismo humano, pelo que os seus efeitos nas células se devem à sua estrutura propriamente dita. Vários estudos têm evidenciado que a diosgenina tem efeitos indutores da apoptose (Minorics, 2010), facto que também deve ser equacionado nos nossos resultados.

Na extrapolação dos dados obtidos neste tipo de ensaios celulares para o que deverá acontecer *in vivo*, é sempre necessário ter em conta a heterogeneidade intra e intertumoral, a escolha da concentração de fármaco relevante para determinado tumor, a interferência das condições experimentais e a pressão de seleção nas células tumorais exercida pelo sistema experimental. Não nos podemos esquecer que o próprio processo de cultura celular causa *stress oxidativo*, quer por facilitar a geração de espécies reativas de oxigénio, quer por poder impedir a regulação adaptativa dos antioxidantes celulares (Halliwell, 2004), existindo sempre um erro associado a estas determinações nas linhas celulares.

Só se pôde calcular a IC_{50} na maioria dos compostos que conseguiram diminuir a viabilidade celular relativa para valores da ordem dos 50% e inferiores (Tabela 7).

Tabela 7 - Valor de IC₅₀ para cada um dos compostos estudados

Linha celular	Composto estudado	IC ₅₀ (μM)	R ²
NHDF	pregnenolona	95,44	0,9433
	7-oxopregnenolona	>100	ND
	DHEA	>100	ND
	7-oxo DHEA	>100	ND
	diosgenina	38,67	0,9530
	7-oxodiosgenina	63,17	0,9747
MCF-7	pregnenolona	168,2	0,8996
	7-oxopregnenolona	>100	ND
	DHEA	>100	ND
	7-oxo DHEA	>100	ND
	diosgenina	19,55	0,9789
	7-oxodiosgenina	ND	ND
LNCaP	pregnenolona	>100	ND
	7-oxopregnenolona	>100	ND
	DHEA	0,47	0,8531
	7-oxo DHEA	>100	ND
	diosgenina	43.36	0,9292
	7-oxodiosgenina	ND	ND

3.5 Conclusões e perspectivas futuras

As estratégias de síntese escolhidas permitiram a obtenção dos compostos pretendidos puros.

Os dados obtidos no ensaio do DPPH para estes Δ^5 -esteroides e seus derivados 7-oxidados mostram baixas capacidades captadoras de radicais, nomeadamente em comparação com o estradiol e com o trolox. Contudo, verificou-se que os Δ^5 -esteroides têm maior capacidade captadora de radicais que os seus derivados 7-oxidados. No entanto, não podemos afirmar que os 7-oxoderivados sintetizados não têm atividade antioxidante, pois podem, por exemplo, induzir a expressão de enzimas antioxidantes.

As conclusões retiradas neste ensaio *in vitro* não podem ser diretamente extrapoladas para condições *in vivo* dado que no ensaio só se estava a trabalhar com os compostos puros e com os solventes, não tendo em conta todos os fatores fisiológicos que podem estar implicados neste processo de defesa contra radicais livres no organismo humano e a especificidade de cada célula, tecido ou órgão onde este processo acontece. Como no organismo humano não se atingem concentrações destes esteroides e dos seus derivados oxidados tão elevadas como as que foram utilizadas nos ensaios de DPPH, poderá não existir necessidade de fazer ensaios com concentrações mais elevadas do que as já estudadas

Em relação aos ensaios de viabilidade celular (ensaio do MTT), os compostos que se mostraram mais tóxicos para as células foram a diosgenina e o seu derivado oxidado. Assim, consideramos que estes compostos são os que têm maior potencial como agentes anticancerígenos.

Neste estudo evidenciou-se também, que os Δ^5 -esteroides têm maior ação antiproliferativa nos três tipos de células que os seus 7-oxoderivados. Assim, a introdução deste grupo funcional nos compostos-mãe tem efeito positivo no que respeita à viabilidade celular. De facto, até parece haver uma tendência para um estímulo da proliferação celular no caso do 7-oxoDHEA nas células cancerígenas. Esta observação indica que os efeitos deste compostos em células têm de ser melhor avaliados.

Num próximo trabalho, poder-se-á avaliar a atividade antioxidante destes compostos realizando ensaios em linhas celulares, tais como ensaios de viabilidade celular com MTT (como o realizado neste trabalho experimental) com pré-, co- e pós-exposição dos compostos com oxidantes (por exemplo, hidroperóxido de cumeno ou peróxido de hidrogénio). Também se poderá avaliar a formação de ROS num ensaio com acetato de diclorofluoresceína, por citometria de fluxo. Outra hipótese será avaliar expressão de enzimas antioxidantes, por RT-PCR, por expressão proteica (*western blot*, por exemplo) ou mesmo por avaliação de atividades enzimáticas.

Em relação à ação antiproliferativa, dever-se-á aumentar o *n* de forma a obter dados com maior significância estatística. O aumento do tempo de exposição aos compostos é outra hipótese a considerar. Poder-se-á também tentar elucidar o possível mecanismo de morte celular, nomeadamente por citometria de fluxo. Os ensaios em cocultura de células serão também uma alternativa a considerar no futuro, pois um tumor, não sendo uma massa homogénea é constituído por diferentes células e ao testarmos os compostos em apenas uma linha celular cancerígena, não estamos a ter em conta os efeitos que estes poderão exercer noutras células (Miki, 2012).

Poder-se-á ainda determinar se as células metabolizam os compostos aos seus derivados oxidados, nomeadamente utilizando um solvente orgânico para extrair os esteroides e realizar uma TLC comparativa com padrões adequados; posteriormente poder-se-á tentar separar e purificar os esteroides e efetuar a sua caracterização estrutural.

Pode equacionar-se avaliar também o potencial efeito hormonal dos compostos, nomeadamente num ensaio de viabilidade celular utilizando meio com FBS tratado com carvão ativado de forma minimizar a quantidade de esteroides.

4 Bibliografia¹

American Cancer Society, Breast Cancer Facts & Figures 2011-2012, Atlanta: American Cancer Society, Inc.

Arsenou ES, Koutsourea AI, Fousteris MA *et al*, (2003a), Optimization of the allylic oxidation in the synthesis of 7-keto- Δ^5 -steroidal substrates, *Steroids*, 68, 407-414

Arsenou ES, Fousteris MA, Koutsourea AI *et al*, (2003b), 7-Keto- Δ^5 -steroids: Key-Molecules Owing Particular Biological and Chemical Interest, *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 3, 557-567

Avendaño C., Introducción a la Química Farmacéutica, Mc-Graw-Hill, 2ª Ed., 2001

Brand-Williams W, Cuvelier ME e Berset C (1994) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *Lebensm.-Wiss. u. Technol.*, 28, 25-30

Butterfield DA, Kansj J, (2001), Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins, *Mechanisms of Ageing and Development*, 122, 945-962

Cascio C, Brown RC, Hales DB *et al*, (2001), Pathways of dehydroepiandrosterone formation in rat brain glia, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 75, 177-186

Choudhary MI, Shah SAA, Sami A *et al*, (2005) Fungal Metabolites of (E)-Guggusterone and Their Antibacterial and Radical-Scavenging Activities, *Chemistry & Biodiversity*, 2, 516-524

Conselho do Colégio de Especialidade em Farmácia Hospitalar, (1999), Boas Práticas de Farmácia Hospitalar, Ordem dos Farmacêuticos sob coordenação

Dincer C, Topuz A, Sahin-Nadeem H *et al*, (2012), A Comparative Study on phenolic composition, antioxidant activity and essential oil content of wild cultivated sage (*Salvia fruticosa* Miller) as influenced by storage, *Industrial Crops and Products*, 39, 170-176

Djeridane A, Yousfi M, Brunel JM *et al*, (2010), Isolation and characterization of a new steroid derivative as a powerful antioxidant from *Cleome arabica* in screening the in vitro antioxidant capacity of 18 Algerian medicinal plants, *Food and Chemical Toxicology*, 48, 2599-2606

¹ A organização da Bibliografia foi efectuada de acordo com as normas da APA - American Physiological Association

Dudas B, Hanin I, Rose M, (2004), Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7 β -hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid, *Neurobiology of Disease*, 15, 262-268

Fotakis G, Timbrell A, (2006) In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride, *Toxicology Letters*, 160, 171-177

Foye, W et al (2002) Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Lippincott Williams & Wilkins

Galvin JE, Sadowsk CH, (2012), Practical Guidelines for the Recognition and Diagnosis of Dementia, *Journal of American Board of Family Medicine*, 25, 367-382

Gaši KP, Djurendić E, Dojcinović-Vujašković S et al, (2012), Synthesis, anti-oxidant activity, and cytotoxicity of salicyloyl derivatives of estra-1,3,5(10)-triene and androst-5-ene, *Chemical Papers*, 66 (4), 284-294

Gong G, Qin Y, Huang W et al, (2010), Protective effects of diosgenin in the hyperlipidemic rat model and in human vascular endothelial cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis, *Chemico-Biological Interactions*, 184, 366-375

González AG, Freire R, Salazar JA et al, (1971), 7-Ketotamusgenin, 7-ketodiosgenin, 25S-hydroxytamusgenin and afurigenin, four new steroidal sapogenins from *Tamus edulis*, *Phytochemistry*, 10, 1339-1346

Grupo de Revisão das Boas Práticas Farmacêuticas, (2009), Boas Práticas de Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF2009), Revisão nº 3 de 2009

Hanahan D, Weinberg RA, (2000), The Hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57-70

Halliwell B, Whiteman M, (2004) Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *British Journal of Pharmacology*, 142, 231-255

Huang D, Ou B e Prior R (2005) The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53, 1841 - 1856

Ionita P, (2005) Is DPPH Stable Radical a Good Scavenger for Oxygen Active Species?, *Chemical Papers*, 59, 11-16

Jankovic J (2008), Parkinson's disease: clinical features and diagnosis, *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 79, 368-376

Jellinck PH, Lee SJ, McEwen, (2001) Metabolism of dehydroepiandrosterone by rat hippocampal cells in culture: possible role of aromatization and 7-hidroxilation in neuroprotection, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 93, 81-86

Kedare SB, Singh RP (2011) Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *J. Food Science and Technology*, 48(4): 412-422

Kihel LE, (2012) Oxidative metabolism of dehydroepiandrosterone (DHEA) and biologically active oxygenated metabolites of DHEA and epiandrosterone (EpiA) - Recent reports, *Steroids*, 77, 10-26

Kim SB, Hill M, Kwak YT *et al*, (2003), Neurosteroids: cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnosis, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88, 5199-5206

Kirma NB, Tekmal RR, (2012), Transgenic mouse models of hormonal mammary carcinogenesis: Advantages and limitations, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, doi:10.1016/j.jsbmb.2011.11.005

Lardy H, Kneer N, Wei Y *et al*, (1998), Ergosteroids II: Biologically active metabolites and synthetic derivatives of dehydroepiandrosterone, *Steroids*, 63, 158-163

Lathe R, (2002), Steroid and sterol 7-hydroxylation: ancient pathways, *Steroids*, 67, 967-977

Li Y, Wu X, Lee TB *et al*, (2010), An Effective Method for Allylic Oxidation of Δ^5 -Steroids Using tert-Butyl Hydroperoxide, *Journal of Organic Chemistry*, 75, 1807-1810

Lin JT, Lee Y, Hou CR *et al*, (2012), Antioxidant, anti-proliferative and cyclooxygenase-2 inhibitory activities of ethanolic extracts from lemon balm (*Melissa officinalis* L.) leaves, *LWT - Food Science and Technology*, 49, 1-7

Macefield RC, Metcalfe C, Lane JA *et al*, (2010), Impact of prostate cancer testing: an evaluation of the emotional consequences of a negative biopsy result, *British Journal of Cancer*, 102, 1335-1340

Magalhães LM, Segundo MA, Reis S *et al*, (2008), Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19

Manosroi J, Rueanto K, Boonpisuttinant K *et al*, (2010) Novel Ferrocenic Steroidal Drug Derivatives and Their Bioactivities, *Journal of Medicinal Chemistry*, 53, 3937-3943

Minorics R, Szekeres T, Krupitza G *et al*, (2011), Antiproliferative effects of some novel synthetic solanidine analogs on HL-60 human leukemia cells in vitro, *Steroids*, 76, 156-162

Miki Y, Ono K, Hata S *et al*, (2012), The advantages of co-culture over mono cell culture in stimulating *in vivo* environment, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, doi:10.1016/j.jsbmb.2011.12.004

Molyneux P, (2004) The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219

Moreira VM, (2008), Novos Esteroides Inibidores da Síntese de Androgénios, Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Farmácia de Coimbra.

Morfin R, Starka L, (2001), Neurosteroid 7-hydroxylation products in brain, *International Review of Neurobiology*, 46, 79-95

O cancro da mama, aceso em 20 de abril, 2012, website da Liga Portuguesa contra o Cancro, <http://www.ligacontracancro.pt>

Patrick GL, (2005) An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press, USA, 3rd Edition 312 - 316; 320-322; 324; 328- 29

Parish EJ, Kizito SA e Qiu Z, (2004), Review of Chemical Syntheses of 7-Keto- Δ^5 -sterols, *Lipids*, 39, 801-804

Pelissier MA, Trap C, Malewiak M *et al* (2004), Antioxidant effects of dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat colon, intestine and liver, *Steroids*, 69, 137-144

Pelissier MA, Muller C, Hill M *et al*, (2006), Protection against dextran sodium sulfate-induced colitis by dehydroepiandrosterone and 7 α -hydroxy-dehydroepiandrosterone in the rat, *Steroids*, 71, 240-248

Pringle A, Schmidt W, Deans J *et al*, (2003), 7-Hydroxylated epianfrosterone (7-OH-EPIA), reduces ischemia-induced neuronal damage both in vivo and in vitro, *European Journal of Neuroscience*, 18, 117-124

Salvador JAR, Silvestre SM, (2005), Bismuth-catalyzed allylic oxidation using *t*-butyl hydroperoxide, *Tetrahedron Letters*, 46, 2581-2584

Salvador JAR, Silvestre SM, Moreira VM, (2006), Catalytic Oxidative Processes in Steroid Chemistry: Allylic Oxidation, β -Selective Epoxidation, Alcohol Oxidation and Remote Functionalization Reactions, *Current Organic Chemistry*, 10, 2227-2257

Scherer R, Godoy HT, (2009) Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method, *Food Chemistry*, 112, 654-658

Schipper H M, (2004), Brain iron deposition and the free radical-mitochondrial theory of ageing, *Ageing Research Reviews*, 3, 265-301

Silvestre SM, (2007), Novos Processos de Oxidação Ambientalmente Aceitáveis Usando Esteroides como Substratos, Dissertação de Doutorado apresentada à Faculdade de Farmácia de Coimbra

Szendi Z, Forgó P, Sweet F, (1995), Complete ^1H and ^{13}C NMR spectra of pregnenolone, *Steroids*, 60, 442-446

Trincal M, Loeper D, Pompon D *et al*, (2002), DHEA metabolism in the brain production and effects of the 7α -hydroxylated derivative, E-publishing Taylor and Francis, 117-128

Valko M, Leibfritz D, Moncol J *et al*, (2007), Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84

Wan H, Williams P, Doherty DF *et al*, (1994), A study of the reproducibility of the MTT test, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5, 154-159

Wells BG, DiPiro JT, Schwinghammer TI, DiPiro CV, *Pharmacotherapy Handbook*, 7th edition, McGrawHill Medical, 2009

Yoshida S, Honda A, Matsuzaki Y *et al*, (2003), Anti-proliferative action of endogenous dehydroepiandrosterone metabolites on human cancer cell lines, *Steroids*, 68, 73-83

Anexos

Tabela - Serviços existentes no HESE, EPE

Departamento	Internamento	Consulta Externa	Hospital Dia	MCDT
Área Médica	<p>Cardiologia Dermatologia Gastroenterologia Hematologia Medicina Interna Nefrologia Neurologia Pneumologia</p> <p>Hematologia Oncológica Oncologia Médica Pneumologia Oncológica CAVC</p>	<p>Cardiologia Dermatologia Gastroenterologia Hematologia Medicina Interna Nefrologia Neurologia Pneumologia Reumatologia Imunoalergologia Hematologia Oncológica Oncologia Pneumologia Oncológica Consulta da Dor</p> <p>Radioterapia</p>	<p>Hematologia</p> <p>Nefrologia</p> <p>Hematologia Oncológica Oncologia Pneumologia Oncológica</p> <p>Quimioterapia Radioterapia Braquiterapia</p>	<p>Técnicas de Cardiologia Hemodinâmica Técnicas Dermatologia Técnicas de Gastroenterologia</p> <p>Técnicas de Nefrologia Técnicas de Neurologia Técnicas de Pneumologia</p> <p>Técnicas de Imunoalergologia</p>
Área Cirúrgica	<p>Cirurgia Geral Ortopedia Urologia Ginecologia Obstetrícia Oftalmologia ORL Cirurgia Plástica Estomatologia Maxilo-Facial</p>	<p>Cirurgia Geral Ortopedia Urologia Ginecologia Obstetrícia Oftalmologia ORL Cirurgia Plástica Estomatologia Maxilo-Facial Anestesia</p>	<p>Cirurgia de Ambulatório</p>	<p>Técnicas de Urologia</p> <p>Técnicas de Oftalmologia Técnicas de ORL</p> <p>Técnicas de Estomatologia Técnicas de Anestesiologia</p>
Área Materno-Infantil	<p>Pediatria Cirúrgica Pediatria Médica Pediatria Ortopédica Ginecologia Neurologia Obstetrícia</p>	<p>Pediatria Cirúrgica Pediatria Médica Pediatria Ortopédica Ginecologia Neurologia Obstetrícia</p>	<p>Pediatria Cirúrgica Pediatria Médica</p> <p>Pediatria Imunoalergologia</p>	<p>Técnicas de Ginecologia Técnicas de Obstetrícia</p>
Medicina Física / Convalescença	<p>Medicina Física e Reabilitação Unidade de Convalescença</p>			<p>Fisioterapia Terapia Ocupacional Terapia da Fala</p>
Saúde Mental	<p>Psiquiatria</p>	<p>Psiquiatria Psicologia Clínica</p>	<p>Psiquiatria Infantil</p>	<p>Terapia Ocupacional Terapia da Fala</p>
Área Urgência / Emergência	<p>UCI Polivalente UCI Cardíaca UICDMC - Adultos UICDMC - Pediatria UCI Neonatologia</p>			
MCDT		<p>Patologia Clínica Imuno-Hemoterapia</p>	<p>Imuno-Hemoterapia</p>	<p>Imagiologia Convencional TAC Ressonância Magnética Patologia Clínica Imuno-Hemoterapia Anatomia Patológica</p>

Normas de Armazenamento para os Gases Medicinais

Os cilindros de oxigénio menores que 5 litros devem ser armazenados horizontalmente em prateleira com painéis identificativos de acordo com o seu conteúdo, e nunca em piso molhado

Os cilindros de gás com capacidade superior a 5 litros têm que ser mantidos em posição vertical, com a válvula fechada

Manipular os cilindros de 50 litros de capacidade ou maior com luvas de manipulação limpas e com sapatos de segurança

Os gases anestésicos devem ser armazenados numa área separada

Os gases inflamáveis não devem ser armazenados junto do oxigénio

Os cilindros de gás devem ser segregados em função do tipo e quantidade de gás que contêm, assim como entre cheios e vazios

Todos os cilindros devem estar de algum modo restringidos para não existir perigo de quedas

Normas de Armazenamento para os Gases Medicinais

Nos serviços clínicos, os cilindros devem estar armazenados numa área reservada e delineada, bem ventilada e de forma a que todos os profissionais de saúde saibam a sua localização

Não manipular um cilindro cuja válvula não esteja protegida por uma tulipa, salvo nos cilindros de capacidade inferior a 5 litros

Não levantar o cilindro pela válvula

Conservar os cilindros vazios com a válvula fechada (para evitar processos de corrosão em presença de humidade no seu interior)

Em qualquer manipulação a efetuar nos recipientes de Protóxido de Azoto, utilizar luvas limpas adaptadas a essa utilização e óculos de proteção

É proibido fumar, engordurar os equipamentos e fazer fogo na zona onde se encontram localizados os recipientes pressurizados

Qualquer problema com o cilindro, defeito de fabrico, fuga... detetado aquando da utilização do mesmo deve ser reportado imediatamente ao transportador

Normas de Transporte para os Gases Medicinais

Os cilindros só devem ser transportados com o auxílio de um carrinho próprio para o efeito



Os cilindros devem ser manuseados com cuidado; nunca devem ser pegados na zona da válvula, pontapeados, deixados cair ou fazê-los rolar no chão

Não levantar o cilindro pela válvula

O selo só deve ser removido mesmo antes da utilização do cilindro

Não manipular um cilindro cuja válvula não esteja protegida por uma tulipa, salvo nos cilindros de capacidade inferior a 5 litros

Os carrinhos de transporte e o seu acesso devem encontrar-se sempre livres

Normas de Transporte para os Gases Medicinais

É proibido fumar, engordurar os equipamentos e fazer fogo na zona onde se encontram localizados os recipientes pressurizados

Qualquer problema com o cilindro, defeito de fabrico, fuga... detetado aquando da utilização do mesmo deve ser reportado imediatamente ao transportador

Normas de Utilização de Gases Medicinais

Antes de utilizar qualquer cilindro...

Assegure-se que as suas mãos estão limpas e livres de gordura (ex: creme de mãos) antes de manusear qualquer cilindro ou outro equipamento relacionado por perigo de queimadura



Não aplique substâncias com gordura (vaselina, pomadas, etc.) no rosto dos pacientes

Verifique sempre o nome do gás, a data de validade no rótulo e a cor código do mesmo

Remova o selo de plástico mas mantenha sempre as tampas das válvulas cobertas

Encaixe o conector do equipamento à válvula do cilindro de modo a que fique apertada mas sem utilizar força excessiva

Antes de abrir o cilindro, confira se o equipamento e outras válvulas de controlo de fluxo estão desligados

Abra a válvula de forma progressiva

Nunca force a válvula ao abrir nem a abra completamente

Normas de Utilização de Gases Medicinais

Verifique se existem fugas fechando a válvula e observando o regulador da pressão

Ajuste lentamente o regulador de pressão para a pressão indicada

Abra lentamente as válvulas de controlo de fluxo

Ajuste os debitómetros para prevenir a distribuição excessiva de gás às mascaras, nebulizadores...

Utilize o cilindro até que o regulador de pressão atinja a zona vermelha

Após a utilização de qualquer cilindro...

Desligue a válvula do cilindro e liberte o excesso de gás do equipamento e dos tubos abrindo a válvula de controlo de fluxo durante alguns segundos

Desligue todas as válvulas de controlo do equipamento

Normas de Utilização de Gases Medicinais

Desaperte o conector do equipamento e remova da válvula do cilindro

Não deixe a válvula do cilindro aberta de modo a que escape gás

Conserve os cilindros vazios com a válvula fechada (para evitar processos de corrosão em presença de humidade no seu interior)

É proibido fumar, engordurar os equipamentos e fazer fogo na zona onde se encontram localizados os recipientes pressurizados

Qualquer problema com o cilindro, defeito de fabrico, fuga... detetado aquando da utilização do mesmo deve ser reportado imediatamente ao transportador

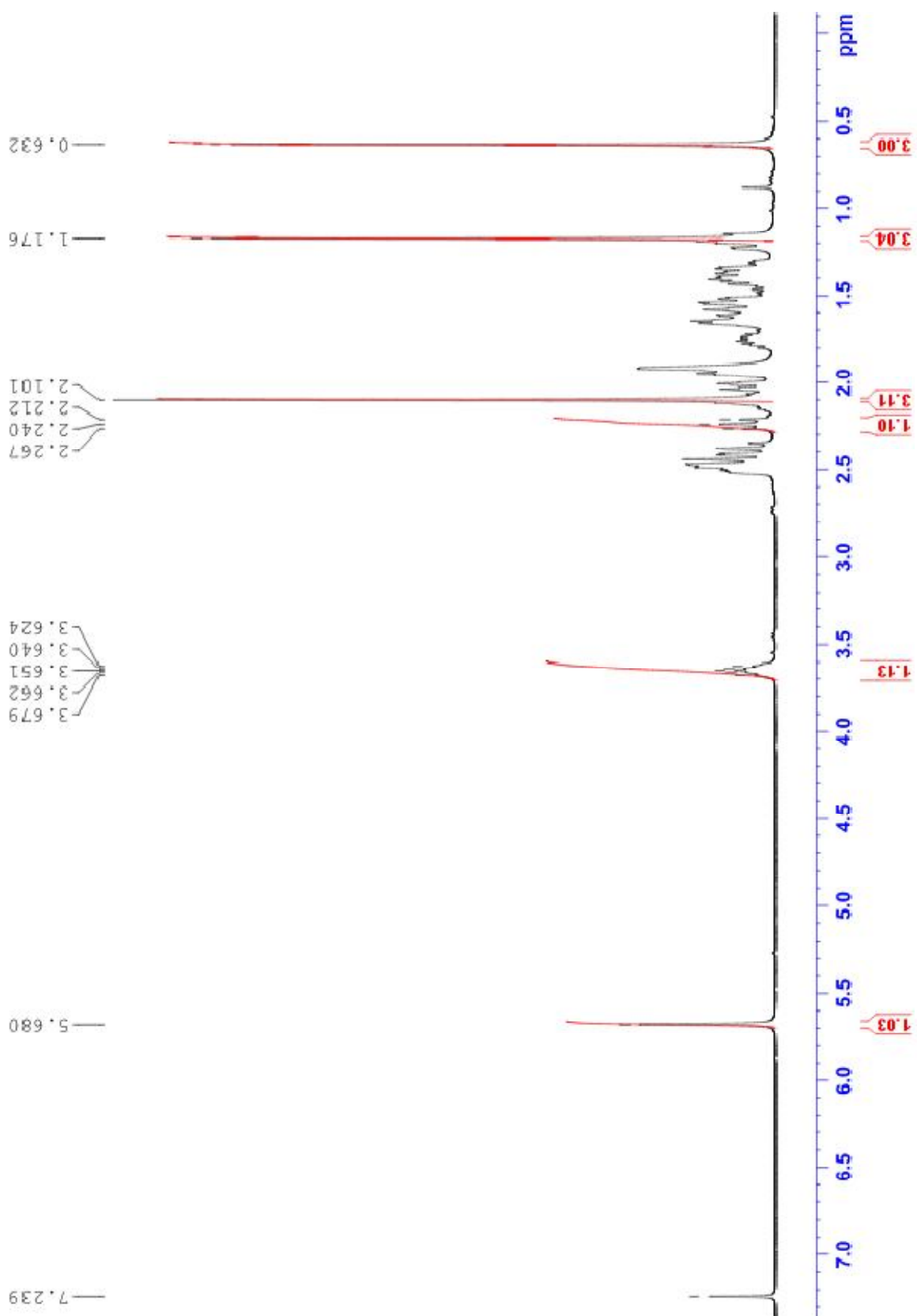


Figura - Espectro de ^1H do composto 7-oxo pregnenolona

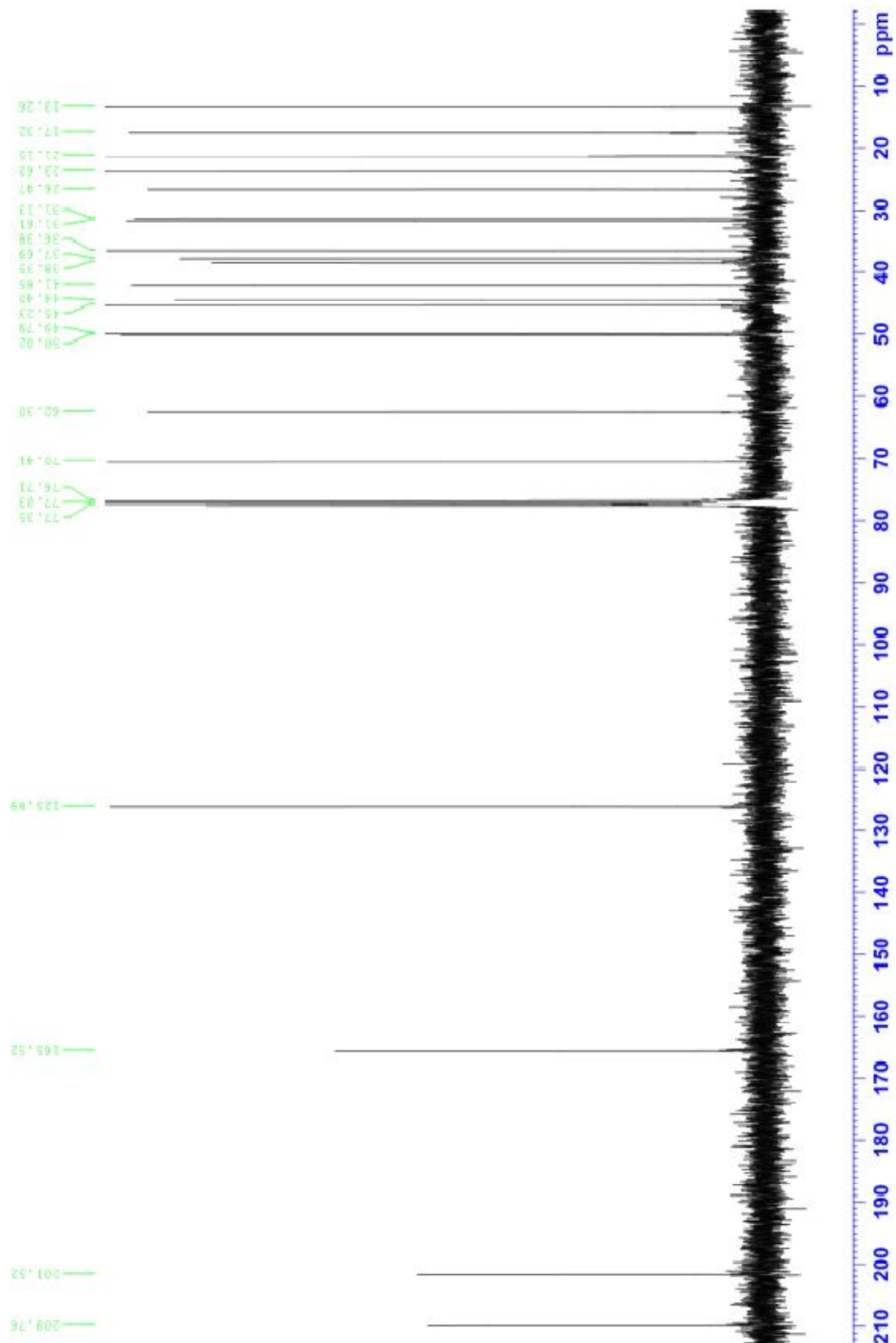


Figura - Espectro ^{13}C do composto 7-oxopregnenolona

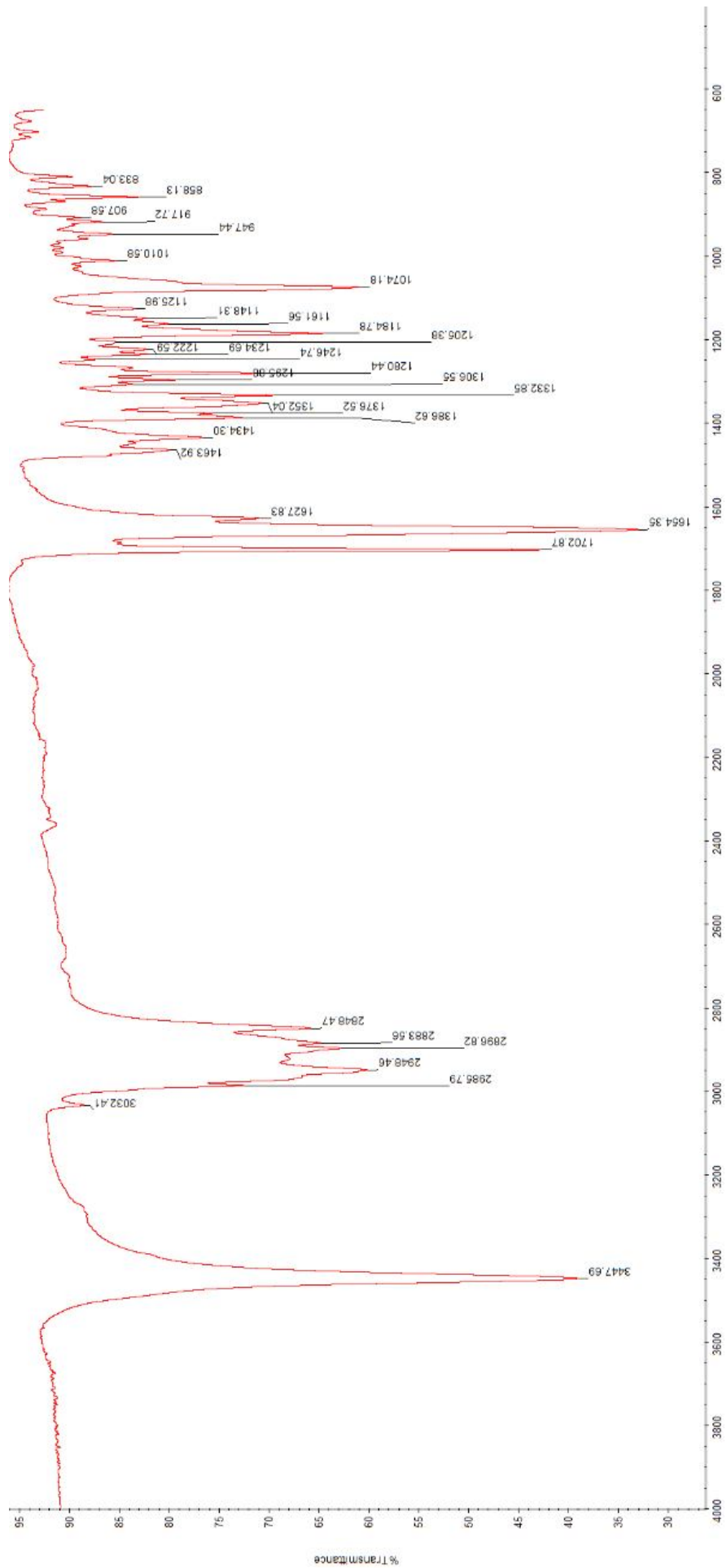


Figura - Espectro IV do composto 7-oxopregnenolona

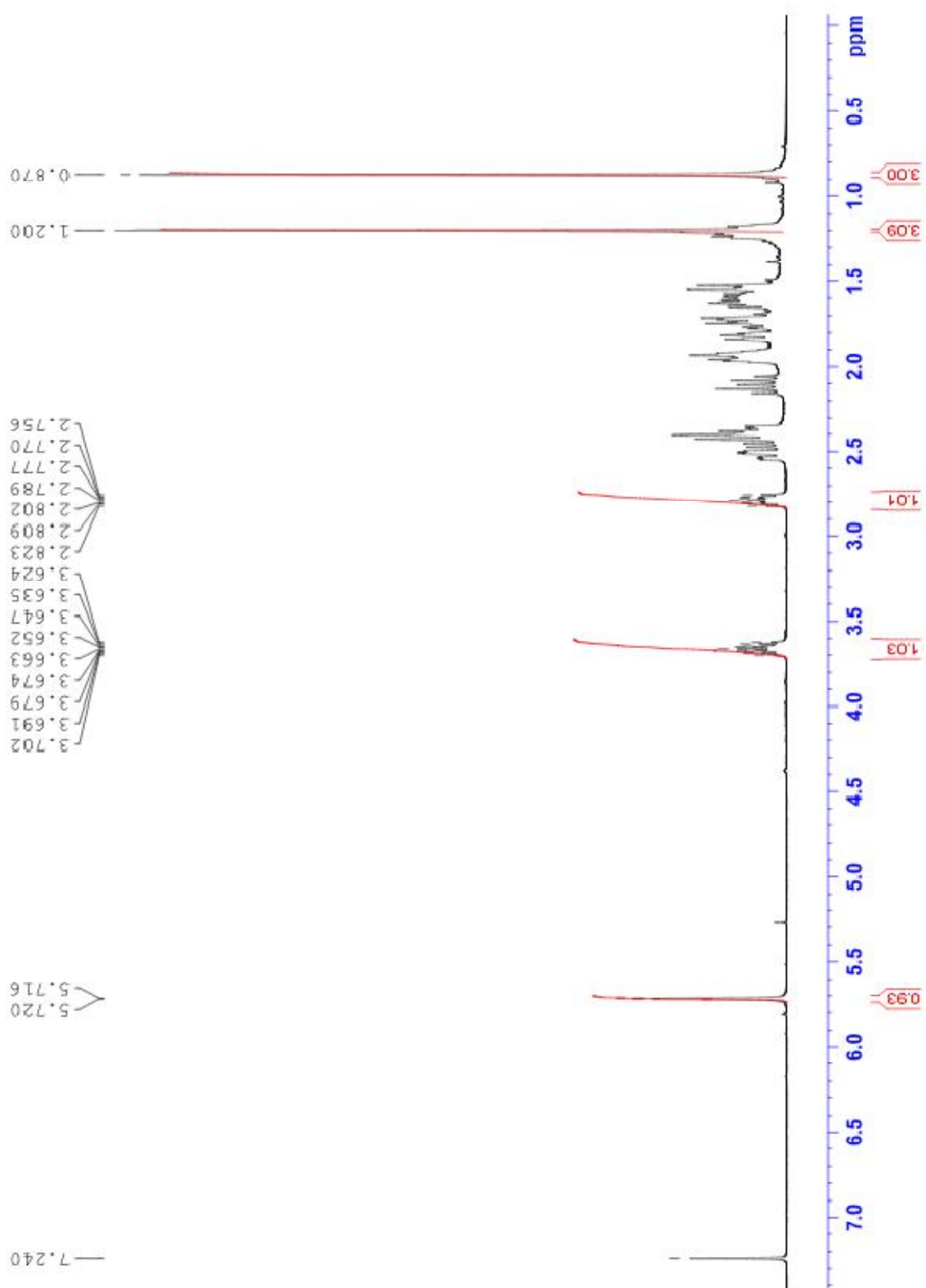


Figura - Espectro ^1H do composto 7-oxoDHEA

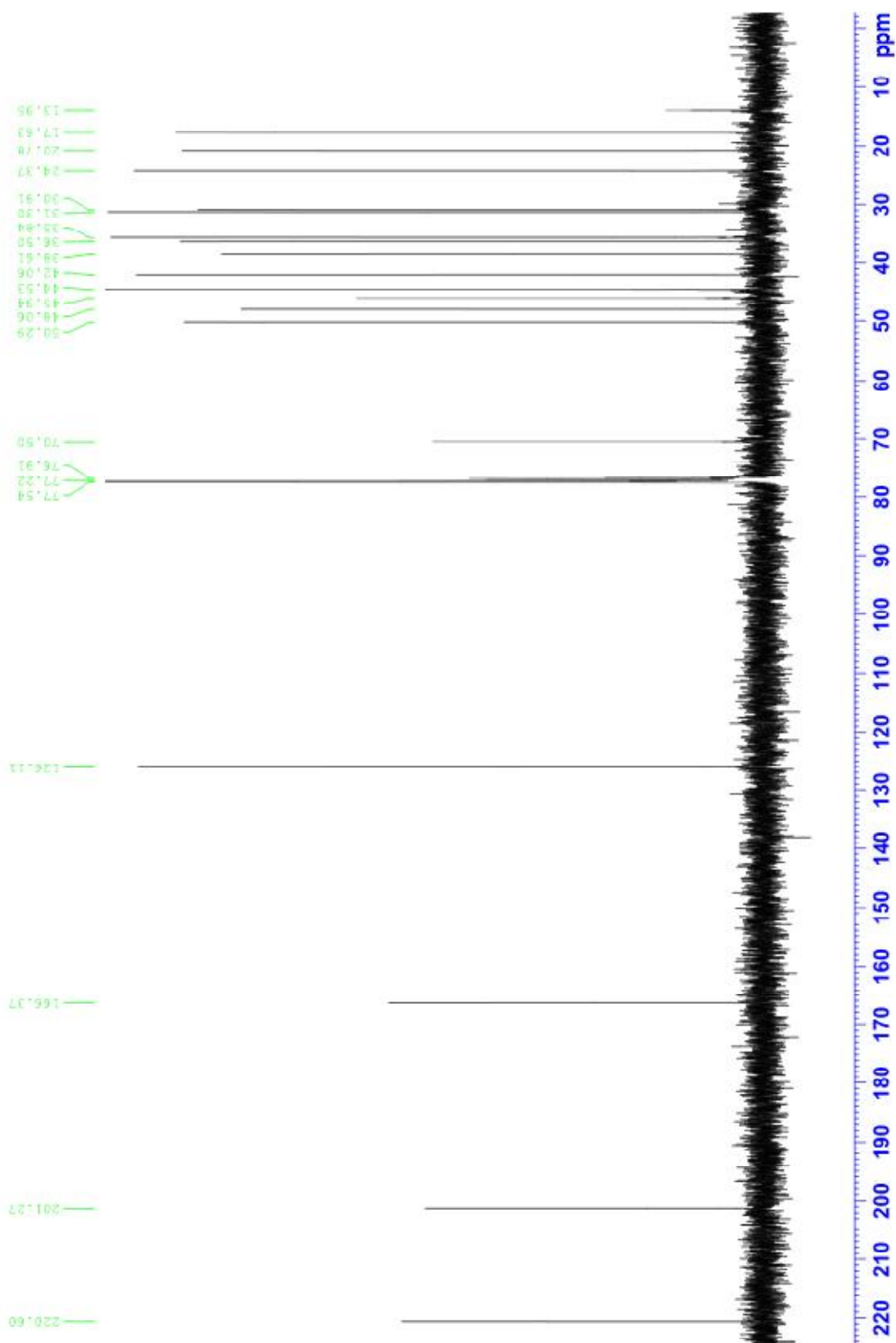


Figura - Espectro ^{13}C do composto 7-oxoDHEA

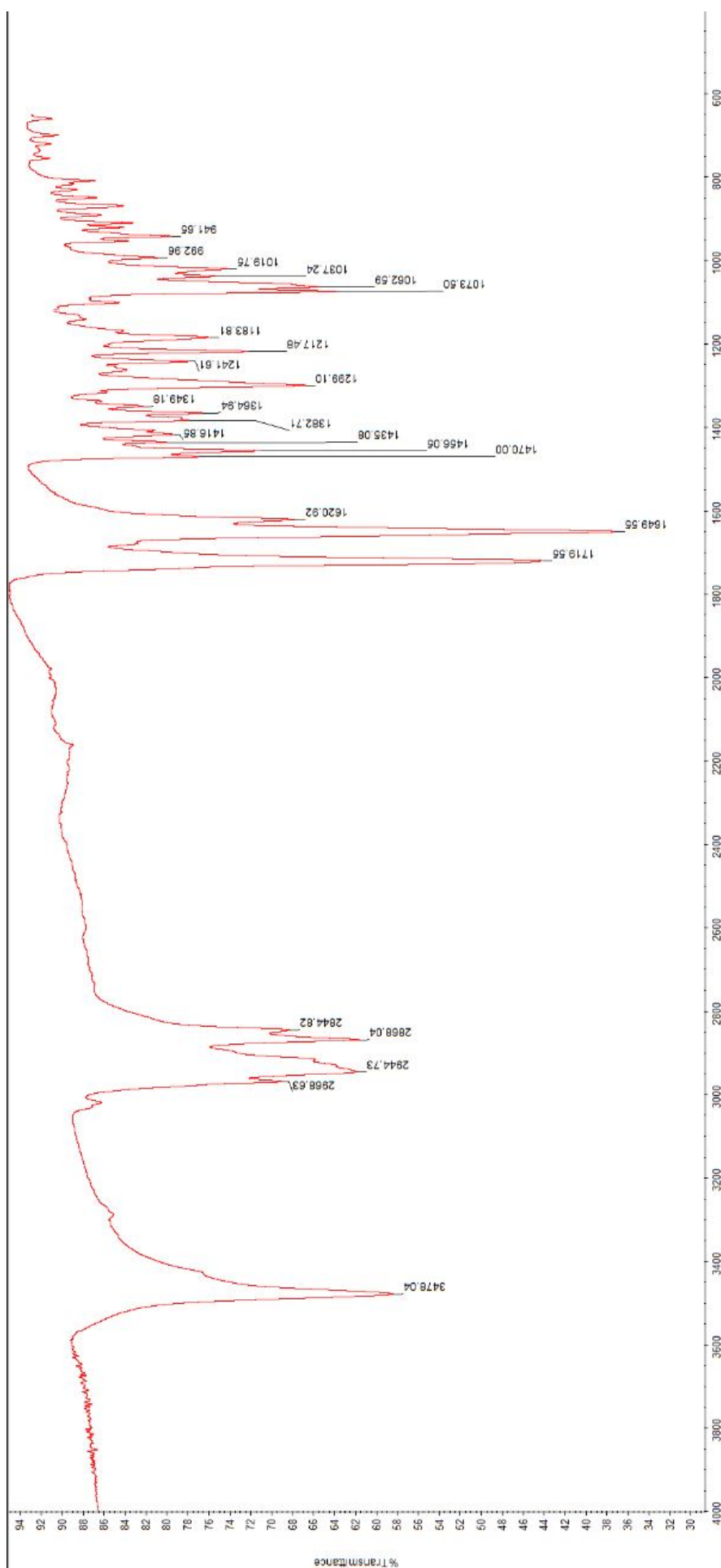


Figura - Espectro IV do composto 7-oxopregnenolona

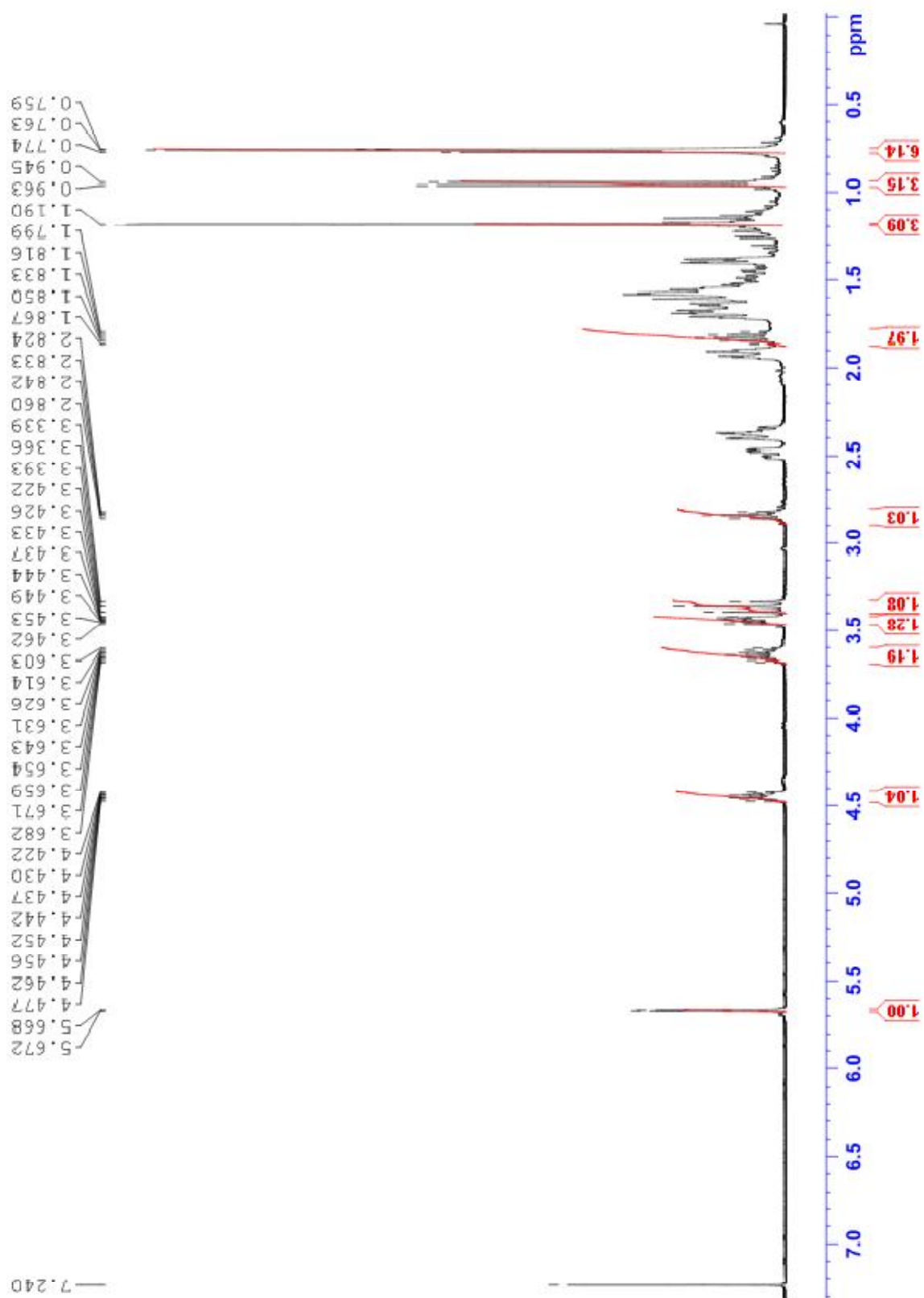


Figura - Espectro ^1H do composto 7-oxodiosgenina

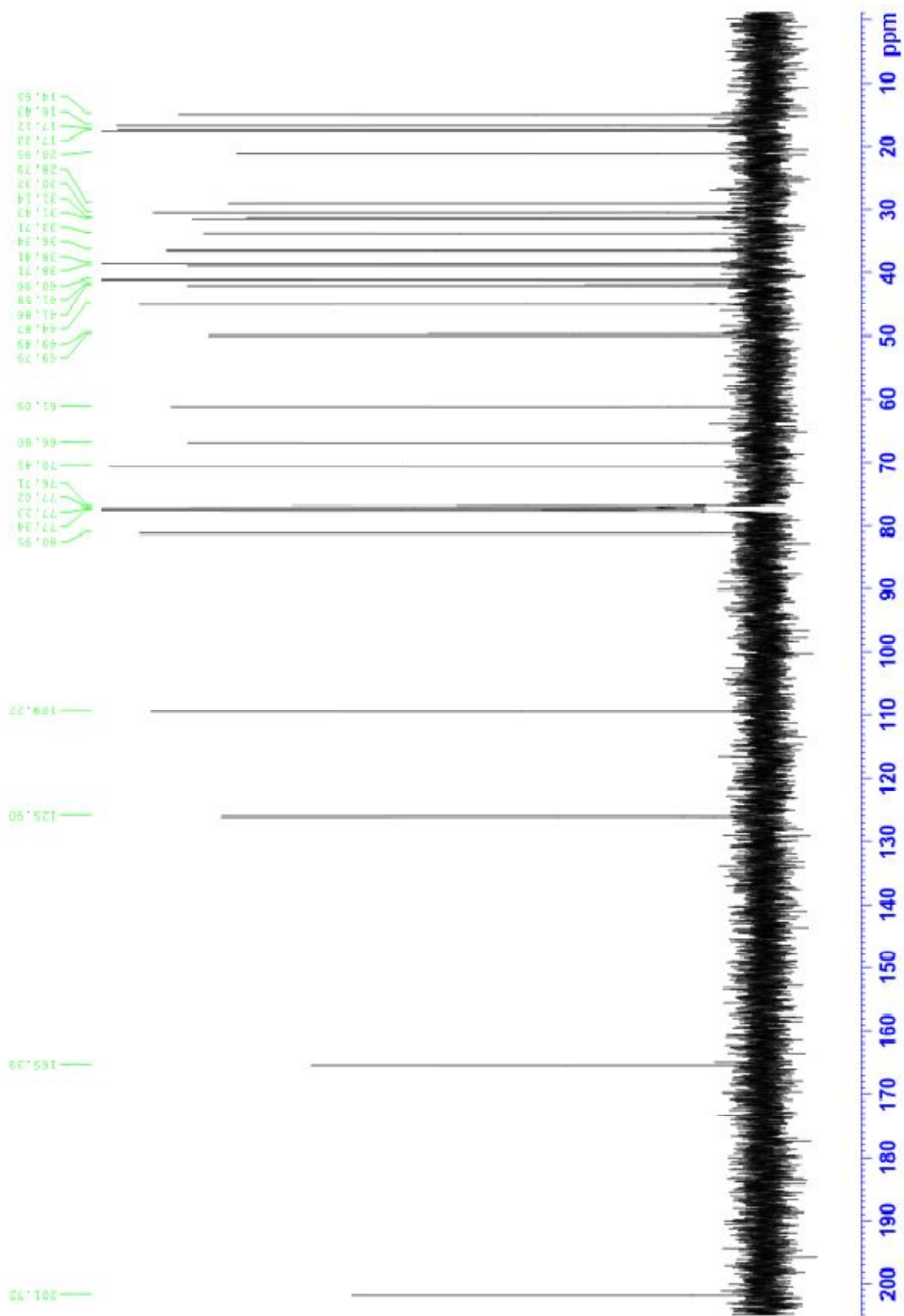


Figura - Espectro ^{13}C do composto 7-oxodiosgenina

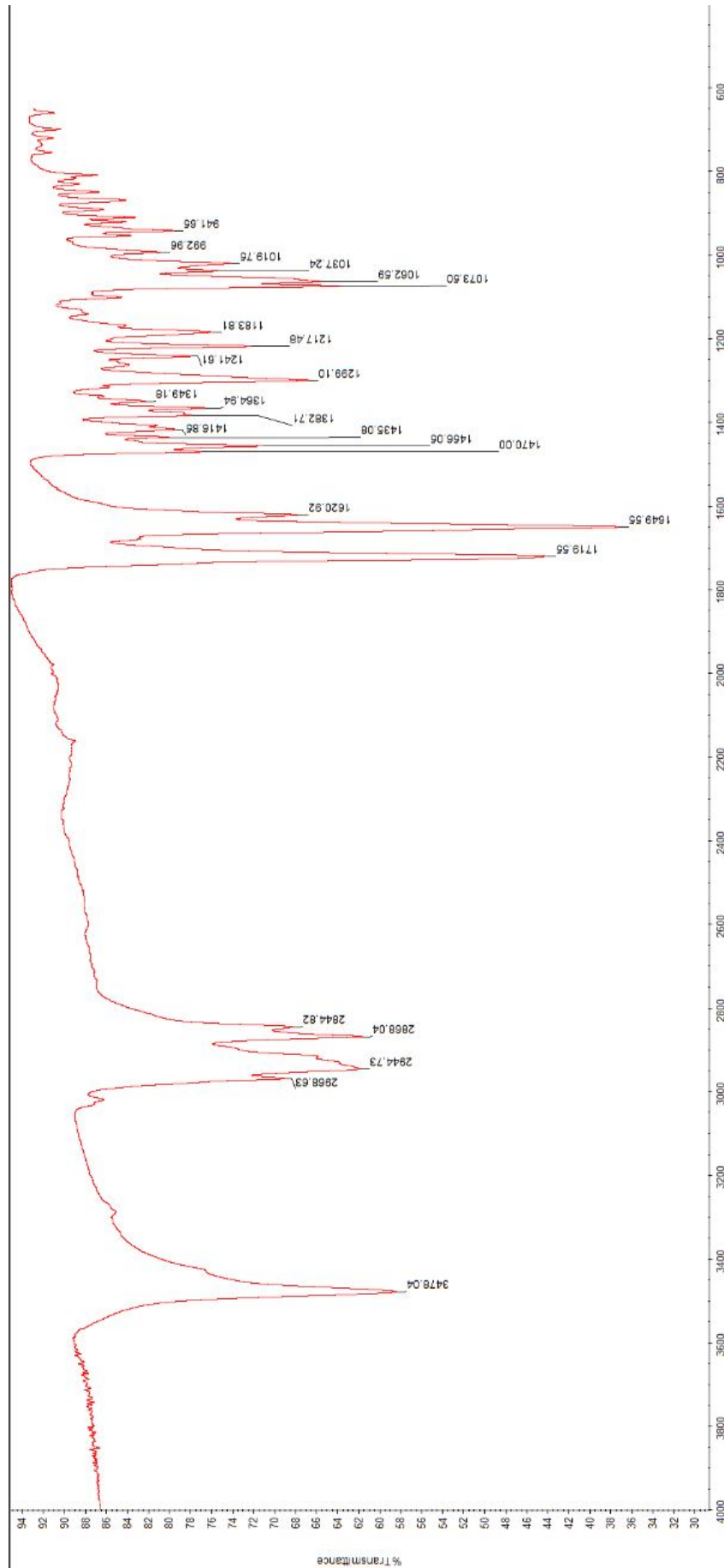


Figura - Espectro IV do composto 7-oxodiosgenina

