

**Caracterização *in vitro* da bioatividade do  
óleo essencial de *Eucalyptus globulus*  
Experiência Profissionalizante na vertente de  
Investigação e Farmácia Comunitária**

**Luís Rafael de Matos Lourinho**

Relatório para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Farmacêuticas**  
(Mestrado Integrado)

Orientador: Professora Doutora Rita Palmeira Oliveira  
Co-orientador: Professora Doutora Joana Rolo  
Co-orientador: Mestre Ana Sofia Oliveira

**outubro de 2021**



## **Agradecimentos**

Agradeço às minhas orientadoras da componente de investigação, a professora Rita Palmeira Oliveira, a professora Joana Rolo e a Ana Sofia Oliveira por toda a dedicação, ajuda e disponibilidade que demonstraram ao longo do período de realização deste trabalho.

Agradeço à equipa da Farmácia São Cosme que foram incansáveis comigo. Agradeço a amabilidade, a dedicação, o altruísmo e todos os conhecimentos que me transmitiram.

Agradeço à minha família, em particular aos meus pais por todo o seu contributo para a minha formação pessoal e profissional, e à minha irmã, por estar sempre do meu lado e me apoiar sempre durante este percurso. E ao Nuno, por estar sempre presente.

E agradeço a todos os meus amigos: os que estiveram sempre comigo, a Joana, o Miguel, a Ana Filipa, a Mariana e o João, e os que a Covilhã me trouxe, o José, o Nicolae, a Ana Raquel, a Inês, a Susana e a Margarida.



## Resumo

Esta dissertação de mestrado encontra-se dividida em dois capítulos: o primeiro visa apresentar o trabalho de investigação em Ciências da Saúde e o segundo é dedicado ao estágio curricular em Farmácia Comunitária.

O Capítulo I baseia-se na investigação desenvolvida no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior (CICS-UBI), sob a orientação da Professora Doutora Rita Palmeira Oliveira, Doutora Joana Rolo e Mestre Ana Sofia Oliveira. O óleo essencial (OE) de *Eucalyptus globulus* tem um grande interesse como possível ingrediente para preparações farmacêuticas terapêuticas ou produtos cosméticos devido a bioatividades já reportadas. O presente estudo visa determinar os efeitos antimicrobianos, a atividade citotóxica e anti-inflamatória do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* e o seu interesse terapêutico e cosmético. A atividade antimicrobiana do OE de *Eucalyptus globulus* foi determinada pelo ensaio de microdiluição contra microrganismos incluídos no *Challenge test* de cosméticos (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*) e em microrganismos que fazem parte da microbiota da pele (*S. epidermidis* e *C. amycolatum*). A atividade citotóxica do extrato nos fibroblastos da pele e macrófagos de ratinho foi determinada através da avaliação do seu efeito na viabilidade celular (ensaio MTT). A atividade anti-inflamatória do extrato foi analisada em macrófagos de ratinho estimulados por LPS, avaliando o seu efeito sobre a produção de óxido nítrico (NO) utilizando o reagente colorimétrico Griess. Além disso, o extrato foi avaliado quanto à sua capacidade de captar NO, utilizando (*S*)-Nitroso-Nacetylpenicillamine (SNAP) como um doador de NO, num modelo não celular. Verificámos que o OE de *E. globulus* é ativo reduzindo o crescimento microbiano da *C. albicans* e *A. brasiliensis*. Entre as bactérias Gram-positivas testadas, o OE de *E. globulus* é mais ativo contra um patógeno da pele, *C. amycolatum*. Os nossos resultados mostraram que o OE afeta a viabilidade celular de uma forma dose-dependente, apresentando efeitos citotóxicos na maioria das concentrações testadas. O extrato foi capaz de inibir a produção de nitritos de forma dose-dependente. em concentrações não citotóxicas, e mostrou ter atividade *scavenging* nas concentrações mais elevadas, não justificando assim a redução de nitritos dos macrófagos estimulados por LPS. São necessários estudos futuros para compreender a bioatividade deste óleo, determinar a sua toxicidade noutros modelos e assim beneficiar dos efeitos benéficos do extrato em segurança.

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

No capítulo II resume-se a experiência e aprendizagem obtida durante o estágio na Farmácia São Cosme, na Covilhã, entre 8 de fevereiro e 18 de junho de 2021, sob a orientação do Dr. Carlos Tavares.

### **Palavras-chave**

Atividade anti-inflamatória;Atividade antimicrobiana;Atividade citotóxica;*Eucalyptus globulus*;Óleo essencial;Farmácia comunitária



## Abstract

This dissertation is divided in two chapters: the first one presents the research work developed in the health sciences field and the second is dedicated to the internship in Community Pharmacy.

Chapter I is based on the research developed at the Health Sciences Research Center of the University of Beira Interior, under the guidance of Doctor Rita Palmeira Oliveira, Doctor Joana Rolo and Dr Ana Sofia Oliveira. *Eucalyptus globulus*' essential oil is interesting as a possible ingredient for therapeutic pharmaceutical preparations or cosmetic products due to previously reported bioactivities. The present study aims to determine the antimicrobial effects, cytotoxic and anti-inflammatory activity of *Eucalyptus globulus*' essential oil and its therapeutic and cosmetic interest. The antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus*' essential oil was determined by the microdilution assay against microorganisms included in the cosmetics Challenge test (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* and *A. brasiliensis*) as well as microorganisms that are part of the skin microbiota (*S. epidermidis* e *C. amycolatum*). The cytotoxic activity of the extract on mouse skin fibroblasts and mouse macrophages was determined by evaluating its effect on cellular viability (MTT assay). The extract's anti-inflammatory activity was investigated on LPS-stimulated mouse macrophages by evaluating its effect on the production of nitric oxide (NO) using Griess colorimetric reagent. Additionally, the extract was evaluated for its ability to scavenge NO, using (S)-Nitroso-Nacetylpenicillamine (SNAP) as a NO donor, in a non-cellular model. We found that the *E. globulus*' essential oil was active reducing microbial growth specifically against *C. albicans* and *A. brasiliensis*. Among the Gram-positive bacteria tested, *E. globulus*' essential oil was more active against a skin pathogen, *C. amycolatum*. Our results showed that the essential oil affects cell viability in a dose-dependent manner, presenting cytotoxic effects at most concentrations tested. The extract was able to inhibit nitrites production in a dose-dependent manner, at non-cytotoxic concentrations, and showed only modest scavenging activity at the highest concentrations, thus not justifying the high reduction of nitrites by LPS stimulated macrophages. Future studies are needed to understand the mechanism of this oil, determine the toxicity and enhance the beneficial effects of the extract.

Chapter II is a summary of the experience and learning acquired during the internship at São Cosme Pharmacy in Covilhã, between February 8<sup>th</sup> and June 18<sup>th</sup> 2021, under the guidance of Dr. Carlos Tavares.

## **Keywords**

Anti-inflammatory activity;Antimicrobial activity;Cytotoxic activity;Essential oil;*Eucalyptus globulus*;Community pharmacy



# Índice

## Capítulo I – Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

1.Introdução	1
1.1. <i>Eucalyptus globulus</i>	1
1.2. Óleo essencial de <i>E. globulus</i>	2
1.3. Uso do <i>E. globulus</i> na indústria e medicina tradicional	3
2.Objetivos	6
3.Materiais e Métodos	6
3.1. Atividade antimicrobiana	6
3.1.1. Estirpes	7
3.1.2. Reagentes	7
3.1.3. Determinação da Concentração mínima inibitória	8
3.1.3 Tratamento de Resultados	10
3.2. Atividade citotóxica	11
3.2.1. Linhas celulares	11
3.2.2. Reagentes	11
3.2.4. Tratamento dos Resultados	15
3.3. Atividade anti-inflamatória	16
3.3.1. Reagentes	16
3.3.2. Avaliação da produção de NO	17
3.3.3. Scavenging activity	19
3.3.4. Tratamento dos Resultados	20
4.Resultados	21
4.1. Atividade antimicrobiana	21
4.2. Atividade citotóxica	24
4.3. Atividade anti-inflamatória	27
5.Discussão Geral	29
6.Conclusão e perspectivas futuras	34

7. Bibliografia	35
<b>Capítulo II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária</b>	
1. Introdução	40
2. Organização e caracterização da Farmácia	40
2.1. Localização, caracterização dos utentes e horário de funcionamento	40
2.2. Espaço físico da Farmácia	41
2.2.1. Espaço exterior	41
2.2.2. Espaço interior e equipamento	42
2.3. Recursos informáticos	44
2.4. Recursos humanos	45
2.5. Informação e documentação científica	46
3. Medicamentos e outros produtos de saúde	47
3.1. Definição de conceitos	48
3.2. Sistemas de classificação de medicamentos	49
4. Aprovisionamento e Armazenamento	50
4.1. Critérios de seleção de um fornecedor/armazenista	50
4.2. Fornecedores	51
4.3. Critérios de aquisição dos medicamentos e produtos de saúde	51
4.4. Elaboração e conferência de encomendas	52
4.5. Receção de encomendas	53
4.6. Estabelecimento de preços e respetiva margem de comercialização	55
4.7. Armazenamento	55
4.7.1. Controlo da temperatura e humidade	56
4.7.2. Controlo dos prazos de validade	57
4.8. Devoluções	57
5. Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento	58
5.1. Aspetos éticos e deontológicos e informação ao utente	58
5.2. Farmacovigilância	59
5.3. Medicamentos fora de uso – VALORMED	60

5.4. Programa de Troca de Seringas (PTS)	60
6. Dispensa de medicamentos	61
6.1. Receitas médicas e respetiva validação	61
6.2. Regimes de participação	65
6.3. Verificação do receituário e faturação às entidades responsáveis	67
6.4. Dispensa de estupefacientes e psicotrópicos	68
6.5. Dispensa de genéricos	69
6.6. Automedicação e aconselhamento	69
7. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde	70
7.1. Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene	71
7.2. Fitoterapia e suplementos alimentares	72
7.3. Medicamentos de uso veterinário	72
7.4. Dispositivos médicos	73
7.5. Produtos dietéticos para alimentação especial	74
8. Cuidados de saúde prestados na FSC	75
8.1. Determinação da glicémia capilar	75
8.2. Determinação de colesterol total	76
8.3. Determinação de peso corporal, altura, IMC e pressão arterial	77
9. Preparação de medicamentos	78
9.1. Medicamentos manipulados	78
9.2. Preparações extemporâneas	79
10. Pandemia COVID-19	80
10.1. Vírus SARS-CoV-2	80
10.2. Medidas de proteção e prevenção implementadas na FSC	80
10.3. Turno de serviço permanente	81
10.4. Dispensa de medicamentos hospitalares	81
10.5. Dispensa de Autoteste COVID-19	81
10.6. “Programa de testagem CVP – Ensino Superior” – Universidade da Beira Interior	82
10.6.1. Registo e Validação	82

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

10.6.2. Preparação, Recolha e Processamento	83
10.6.3. Leitura do resultado e envio da comunicação	83
10.6.4. Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (Nasopharyngeal)	83
11. Formação contínua	84
12. Conclusão	85
13. Referências Bibliográficas	86
14. Anexos	91



## Lista de Figuras

### Capítulo I – Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Figura 1 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio para determinar a CMI.

Figura 2 - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT.

Figura 3 - Representação esquemática da placa de 96 poços na avaliação da produção de NO.

Figura 4 - Representação esquemática de metade da placa de 96 poços após a realização do triplicado para o ensaio da *Scavenging activity*.

Figura 5 – Crescimento bacteriano (% do Controlo) de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. amycolatum*) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde às bactérias expostas ao meio de cultura bacteriano sem a presença do extrato.

Figura 6 - Crescimento bacteriano (% do Controlo) de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde às bactérias expostas ao meio de cultura bacteriano. sem a presença do extrato.

Figura 7 - Crescimento fúngico (% do Controlo) de *C. albicans* e *A. brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde aos fungos expostos ao meio de cultura fúngico. sem a presença do extrato.

Figura 8 - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células 3T3 após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO a 2,50% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

Figura 9 - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células RAW após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO a 2,50% v/v que representa

o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

Figura 10 - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células 3T3 após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de DMSO. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

Figura 11 - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células RAW após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de DMSO. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

Figura 12 - Efeito do OE de *Eucalyptus globulus* na produção de NO pelos macrófagos após a estimulação com LPS. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 µg/mL). “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO a 0,08% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo + LPS” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

Figura 13 – Capacidade *scavenging* de NO do OE de *Eucalyptus globulus*. Os resultados estão expressos como percentagem de libertação de NO desencadeada pelo SNAP. “Solvente” corresponde a DMSO a 2,50% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo + SNAP” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.



## Lista de Tabelas

### **Capítulo I – Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus***

**Tabela 1** - Classificação taxonômica do *Eucalyptus globulus* [6].

**Tabela 2** – Composição, usos/alegações e administração de alguns produtos disponíveis no mercado português que contêm óleo essencial de *E. globulus*.

**Tabela 3** - Estirpes bacterianas e fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana.

**Tabela 4** - Resumo das concentrações utilizadas para testar a atividade citotóxica.

**Tabela 5** - Valores da CMI (% v/v) do OE de *E. globulus* na análise da atividade antimicrobiana.

**Tabela 6** – Valores de IC<sub>50</sub> (% v/v) para cada uma das linhas celulares (3T3 e RAW) na presença do OE de *E. globulus*.

**Tabela 7** – Concentrações biocompatíveis do OE de *E. globulus* e do DSMO para os fibroblastos (3T3) e macrófagos (RAW).

### **Capítulo II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária**

**Tabela 8** - Esquema da classificação ATC para a azitromicina [10].

**Tabela 9** - Valores de referência da glicemia [50].

**Tabela 10** - Valores de referência da pressão arterial [52].



## Lista de Acrónimos

### Capítulo I – Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

CMI	Concentração Mínima Inibitória
DMSO	Dimetilsulfoxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EMA	Agência Europeia do Medicamento
FBS	Soro Fetal Bovino
iNOS	Óxido Nítrico Sintetase
LPS	Lipopolissacarídeo
MHB	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
MOPS	Ácido Morfolinopropanesulfónico
MTT	Metiltiazolildifenil-tetrazolio Bromido
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetases
OE	Óleo Essencial
PBS	Solução Salina com Tampão Fosfato
PDA	<i>Potato-Dextrose Agar</i>
RCF	Força Centrífuga Relativa
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	<i>Sabouraud-Dextrose Agar</i>
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SNAP	<i>S-Nitroso-N-acetylpenicillamine</i>
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>

### Capítulo II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

ANF	Associação Nacional de Farmácias
ARS	Administração Regional de Saúde
ATC	<i>Anatomical Therapeutic Chemical</i>
BPF	Boas Práticas para a Farmácia Comunitária
CCF	Centro de Conferências de Faturas da Maia
CEDIME	Centro de Documentação e Informação de Medicamentos
CIM	Centro de Informação do Medicamento

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

CIMPI	Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada
CNP	Código Nacional do Produto
COVID-19	<i>Coronavirus Disease-19</i>
DCI	Denominação Comum Internacional
DM	Diabetes Mellitus
FGP	Formulários Galénico Português
FP	Farmacopeia Portuguesa
FSC	Farmácia São Cosme
FV	Farmacovigilância
HTA	Hipertensão Arterial
IMC	Índice de Massa Corporal
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.
IVA	Imposto sobre o Valor Acrescentado
LEF	Laboratório de Estudos Farmacêuticos
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MIM	Mestrado Integrado em Medicina
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MNSRM-EF	MNSRM de Dispensa Exclusiva em Farmácia
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
MUV	Medicamento de Uso Veterinário
OF	Ordem dos Farmacêuticos
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PRM	Problemas Relacionados com os Medicamentos
PT	Pontuário Terapêutico
PTS	Programa de Troca de Seringas
PVA	Preço de Venda ao Armazenista
PVF	Preço de Venda à Farmácia
PVP	Preço de Venda ao Público
RAM	Reações Adversas a Medicamentos
RCM	Resumo das Características do Medicamento
RGPD	Regulamento Geral de Proteção de Dados
RNM	Resultados Negativos associados à Medicação
SARS-CoV-2	Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus 2
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

SNS Serviço Nacional de Saúde

VIH Vírus da Imunodeficiência Humana



# Capítulo I – Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

## 1. Introdução

### 1.1. *Eucalyptus globulus*

O género *Eucalyptus* compreende cerca de 700 espécies que são utilizadas na indústria da madeira e celulose, na indústria farmacêutica e na perfumaria [1]. Em Portugal, os eucaliptais representam o terceiro maior grupo de florestas, ocupando cerca de 26 % da área florestal, sendo o *Eucalyptus globulus* a espécie florestal mais abundante em Portugal Continental [2], [3]. O *Eucalyptus globulus* foi introduzido em Portugal a partir dos anos 50 provindo da Austrália do Sul e Tasmânia, com elevada produtividade, sendo a matéria-prima de um dos principais sectores industriais da economia do país, a indústria de pasta para papel [2]–[4].

Contudo, outras atividades têm sido associadas a espécies do género *Eucalyptus*, com estudos *in vitro* a indicarem a existência de potencial antimicrobiano, e particularmente de potencial antivírico, dos seus óleos essenciais. Assim torna-se interessante e útil a realização de novos estudos a fim de caracterizar as propriedades terapêuticas destas espécies [5].

Na Tabela 1 encontra-se a classificação taxonómica do *E. globulus*, retirada do Sistema Integrado de Informação Taxonómica [6].

**Tabela 1** - Classificação taxonómica do *Eucalyptus globulus* [6].

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Divisão</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisão</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordem</b>	<i>Myrtales</i>
<b>Família</b>	<i>Myrtaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Eucalyptus</i>
<b>Espécie</b>	<i>E. globulus</i>

## 1.2. Óleo essencial de *E. globulus*

Os óleos essenciais são compostos voláteis, naturais e complexos, caracterizados por terem um odor forte. São conhecidos pelas suas propriedades antimicrobianas (bactericidas, virucidas e fungicidas), propriedades medicinais e pelas suas fragrâncias. Atualmente, existe uma diversidade de produtos que utilizam os óleos essenciais com diversas finalidades (antimicrobiano, analgésico, sedativo, anti-inflamatório, espasmolítico e anestésico local), sendo por isso estes compostos um objeto de interesse no estudo das suas bioatividades [7].

Existem vários métodos de extração para a obtenção de óleos essenciais, sendo os mais comuns, relativamente ao óleo essencial (OE) de *E. globulus*, a hidro-destilação, destilação a vapor, destilação com solventes, hidrodestilação assistida por microondas, e extração com ultra-sons [8]. Neste trabalho, o OE em estudo foi obtido através de destilação a vapor. Este método consiste na passagem de vapor de água nas folhas do *Eucalyptus globulus*, permitindo que os compostos voláteis evaporem e sejam arrastados até um condensador. No condensador, os compostos arrefecem e ficam misturados com a água e, posteriormente, são separados. Como as folhas contêm pequenas quantidades do extrato, são necessárias grandes quantidades de matéria-prima para produzir uma quantidade suficiente de OE. Este processo utiliza folhas frescas ou secas com rendimentos entre 1,0 % e 2,4 %. A destilação em vapor apresenta várias vantagens como o facto de ser mais barato e de poder ser utilizado em produtos sensíveis à temperatura e insolúveis em água [8], [9].

O principal constituinte do OE de *Eucalyptus globulus* é o 1,8-cineol. Além disso, existem quantidades moderadas de  $\alpha$ -pineno, terpinen-4-ol, aromadendreno, acetato de geranilo, globulol e limoneno, entre outros. No entanto, existem vários fatores que podem condicionar a composição e o rendimento deste óleo essencial, como o método de extração usado, o material, o tempo de extração, a temperatura, a pressão e o estado de desenvolvimento da planta, variando se a extração for realizada com folhas jovens ou adultas [8], [10].

O 1,8-cineol, é um monoterpene encontrado em vários OE, estando muito presente nos extratos do género *Eucalyptus*. Este composto apresenta propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, nomeadamente na possível inibição da produção de espécies reativas de oxigénio e citocinas inflamatórias, que demonstram o interesse na caracterização e possível introdução do OE de *Eucalyptus globulus* em diversos produtos de saúde [11]. Além disso, na área da cosmética, há um crescente interesse na utilização de ingredientes

naturais, como os OE, não só pelas suas propriedades de fragrância, mas também pelos efeitos de conservação da formulação ao nível microbiano, pelos seu potencial anti-inflamatório e pelos seus efeitos benéficos na pele [12], [13]. Devido às bioatividades já reportadas, o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* apresenta um elevado interesse no seu estudo como possível ingrediente para preparações farmacêuticas ou produtos cosméticos.

### **1.3. Uso do *E. globulus* na indústria e medicina tradicional**

Atualmente, existem disponíveis diversos produtos comerciais contendo OE de *E. globulus*. Este OE é também comercializado sem qualquer mistura para utilização com aplicação direta ou diluída. Na Tabela 2, encontra-se um resumo destes produtos, a sua composição, usos e administração.

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

**Tabela 2** – Composição, usos/alegações e administração de alguns produtos disponíveis no mercado português que contêm óleo essencial de *E. globulus*.

Produto	Composição	Usos/alegações	Administração
<b>Blossom Essence®</b> – Óleo essencial de <i>Eucalyptus Globulus</i> [14]	OE de <i>E. globulus</i> 100 %	Tosse, sinusite, asma, rinite alérgica, favorece a eliminação do muco, gripe (vírus influenza) e antisséptico (dermatológico).	Tópica – Diluir 5 gotas de OE numa 1 colher de sopa de óleo vegetal ou 2 gotas de OE diretamente sobre a área a ser tratada.
<b>Biover® – Óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i></b> [15]	OE de <i>E. globulus</i> 100 %	Suavizar a garganta e as vias respiratórias.	Tópica – 1 gota em aplicação local ou várias gotas diluídas num óleo de base. Oral – 3 a 5 gotas por dia.
<b>Rhinomer® Intense <i>Eucalyptus</i> – Spray nasal</b> [16]	OE de <i>E. globulus</i> , água do mar (hipertónica na concentração de 2,2% de sal marinho) e extrato de <i>Mentha arvensis</i>	Descongestionante nasal natural intenso que proporciona um alívio eficaz e natural da congestão nasal, devido a constipações e rinosinusites. Previne o aparecimento de infeções limpando as passagens nasais e ajuda a eliminar as bactérias e vírus presos no muco do nariz; Efeito anti secura, hidratando as cavidades nasais.	Nasal – Uma pulverização em cada narina até 6 vezes ao dia.
<b>Vicks Vaporub®, associação, pomada</b> [17]	Cânfora 50 mg/g; OE de Terebentina 50 mg/g; Levomentol 27,5 mg/g; OE de Eucalipto 15 mg/g.	Tratamento sintomático da congestão nasal e da tosse relacionadas com constipações e gripes.	Tópica – Aplicar no pescoço, peito e costas: 10 a 15 ml (12 ou mais anos); 10 ml (6 aos 12 anos); 2,5 a 5 ml (30 meses aos 6 anos). Inalação – 10 ml num recipiente com água muito quente, mas não a ferver, e inalar 10 a 15 minutos.

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Dentro dos produtos descritos na Tabela 2, encontramos maioritariamente OE de *Eucalyptus globulus* a 100 % de várias marcas comerciais, com finalidades bastante semelhantes como o tratamento sintomático de problemas respiratórios ou para atenuar dores musculares. O Rhinomer® Intense *Eucalyptus* – Spray nasal (dispositivo médico) e o Vicks Vaporub®, associação, pomada (medicamento não sujeito a receita médica), apesar de terem uma forma farmacêutica diferente, centram-se muito também no alívio de problemas respiratórios.

Na literatura, existem diversas formas farmacêuticas e vias de administração deste OE como, formas farmacêuticas líquidas (tópicos, orais ou inalados), cápsulas (moles e gastrorresistentes), aditivo para banho (uso cutâneo) e formas farmacêuticas semi-sólidas (uso cutâneo) [18].

Na monografia do óleo de Eucalipto da Agência Europeia do Medicamento (EMA), encontra-se descrito que este produto é indicado no alívio da tosse e no alívio de dores musculares localizadas [19]. No entanto, estas indicações são apenas relativas ao uso tradicional, não existindo uma utilização bem-estabelecida. Nas situações em que o princípio ativo de um medicamento é utilizado há mais de 10 anos e a sua eficácia e segurança estão bem estabelecidas o pedido de autorização de comercialização pode basear-se em resultados da literatura científica, sendo considerado uma utilização bem-estabelecida [20]. Além disso, este OE apresenta diversas reações adversas já reportadas, nomeadamente reações alérgicas na pele, sendo importante estudar a sua toxicidade [18], [19], [21].

## 2. Objetivos

Esta dissertação e todo o trabalho laboratorial desenvolvido tem como principal objetivo a análise do potencial bioativo de OE de *Eucalyptus globulus*, de forma a determinar o seu interesse terapêutico e cosmético em aplicações dermatológicas.

Numa abordagem mais detalhada, consideram-se ainda os seguintes objetivos:

- Determinar, *in vitro*, a atividade antibacteriana e antifúngica sobre microrganismos padrão e microrganismos da microbiota da pele para avaliação do efeito conservante em formulações cosméticas;
- Determinar, *in vitro*, a atividade citotóxica do OE em linhas celulares de fibroblastos e macrófagos;
- Determinar, *in vitro*, o potencial anti-inflamatório do OE, através da avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos, quando sujeitos a um estímulo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo (LPS);
- Elucidar o mecanismo envolvido na redução da produção de NO, através da avaliação da capacidade do OE de o remover do meio de cultura, através da utilização de um dador de NO.

Além disso, como parte do processo de aprendizagem, todas as técnicas laboratoriais adquiridas contam também como objetivo deste trabalho.

## 3. Materiais e Métodos

O OE de *Eucalyptus globulus* foi produzido em Portugal e adquirido à empresa Blossom Essence®, sediada na Covilhã, Portugal com o lote AV02210497 [14].

No decorrer desta dissertação a espécie *Eucalyptus globulus* será designada por *E. globulus*.

### 3.1. Atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana e antifúngica do OE foi determinada através do método de microdiluição em meio líquido, utilizando placas de 96 poços, adaptado das normas publicadas pela NCCLS: **M7-A6** – Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico; **M27-A2** – Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica e **M38-A** – Método de Referência para

Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos [22]–[24].

### 3.1.1. Estirpes

As estirpes utilizadas na caracterização da atividade antimicrobiana do OE foram adquiridas em coleções de culturas internacionais ATCC e selecionadas de acordo com os microrganismos incluídos no Teste de Desafio de Conservantes - *Challenge test* de cosméticos (**ISO 11930:2019** *Cosmetics – Microbiology – Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product*), especificamente *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*, e microrganismos que fazem parte da microbiota da pele, como *S. epidermidis* e *C. amycolatum* [25]. As estirpes utilizadas, e suas características, encontram-se descritas na Tabela 3.

**Tabela 3** - Estirpes bacterianas e fúngicas, utilizadas no estudo da atividade antimicrobiana.

Espécie de bactéria	Estirpe	Classificação quanto ao tipo de Gram	Indicador de eficácia conservante	Patogéneo relevante
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram-positiva	X	X
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 178970		-	X
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	ATCC 49368		-	X
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	Gram-negativa	X	X
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739		X	X
Espécie de Fungo	Estirpe	Classificação		
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levedura	X	X
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 1604	Fungo Filamentoso	X	X

### 3.1.2. Reagentes

- **Tryptic Soy Agar (TSA)** (VWR Chemicals) – meio sólido para a cultura de bactérias;
- **Mueller-Hinton Broth (MHB)** (VWR Chemicals) – meio líquido para a preparação dos inóculos de bactérias e realização dos ensaios;
- **Sabouraud-Dextrose Agar (SDA)** (VWR Chemicals) – meio sólido para a cultura de leveduras;
- **Potato-Dextrose Agar (PDA)** (VWR Chemicals) – meio sólido para a cultura de fungos filamentosos;

- **RPMI-1640** (*Roswell Park Memorial Institute*) (Sigma-Aldrich®) – meio líquido para a preparações dos inóculos de fungos e realização dos ensaios;
- **Tampão MOPS** (ácido morfolinopropanesulfônico) (BioReagents™) – utilizado na preparação do meio RPMI-1640;
- **Solução Salina (NaCl)** (FisherChemical)– utilizada para preparar a suspensão microbiana com densidade definida, no processo de preparação do inóculo;
- **DMSO (Dimetilsulfoxido)** (FisherChemical) – emulsionante do OE em meio de cultura aquoso.

### **3.1.3. Determinação da Concentração mínima inibitória**

A concentração mínima inibitória (CMI) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de impedir o crescimento visível de um microrganismo. Neste sentido, a CMI do OE foi determinada visualmente, e consistiu na primeira diluição onde se verificou a ausência de turbidez, comparando com os poços de controlo de crescimento microbiano. Esta determinação ocorreu 24h após incubação das bactérias e 48h após incubação dos fungos.

#### **Preparação da solução de trabalho**

De forma a solubilizar o OE com o meio líquido (aquoso) teve de se emulsionar o extrato com DMSO, adicionando-se 100 µL de OE a 100 µL de DMSO. De seguida, efetuou-se a uma diluição (1:10) da solução do extrato:DMSO em meio líquido, sendo esta a solução de trabalho com uma concentração de 5% v/v de OE. Após a realização de diluições sucessivas de 1:2 e da adição de igual volume de meio líquido na placa, foram testadas as seguintes concentrações (% v/v): 2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16 e 0,08.

#### **Preparação do inóculo e inoculação**

- **Bactérias**

As estirpes bacterianas (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *C. amycolatum*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) foram incubadas em placas de Petri com TSA durante 24 horas a uma temperatura de 37°C em condições aeróbias. De seguida, colónias isoladas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl) a 0,85% acertando-se a densidade ótica a 0,5 *McFarland*, que corresponde aproximadamente a  $1-2 \times 10^8$  UFC/mL. Após a suspensão ser homogeneizada, realizou-se uma diluição (1:100), adicionando 150 µL a 14850 µL de MHB, obtendo-se a solução de trabalho do inóculo com aproximadamente  $1 \times 10^6$

UFC/mL. Na placa, o inóculo sofreu uma nova diluição (1:2), originando uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

- **Levedura**

A estirpe de *C. albicans* foi incubada em placas de Petri com SDA durante 48 horas, em estufa a 37 °C. De seguida, as colónias selecionadas foram suspensas em solução salina estéril (NaCl) a 0,85% acertando-se a densidade ótica a 0,5 *McFarland*, que corresponde aproximadamente a  $1 - 5 \times 10^6$  UFC/mL. Após a suspensão ser homogeneizada, realizou-se uma diluição (1:50), adicionando 10 µL a 490 µL de RPMI-1640, seguida de uma diluição de 1:20, adicionando 80 µL da diluição anterior a 1520 µL de meio líquido, obtendo-se a solução de trabalho do inóculo. Na placa o inóculo sofreu uma nova diluição originando uma concentração final de  $0,5 - 2,5 \times 10^3$  UFC/mL.

- **Fungo Filamentoso**

A estirpe de *A. brasiliensis*, foi incubada em placas de Petri com PDA durante 7 dias, em estufa a 35 °C. De seguida, as colónias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de solução salina estéril (NaCl) a 0,85% e, com o auxílio de uma ansa, foram raspadas. A mistura resultante foi retirada e transferida para um *ependorf* que, após agitação em vortex, foi colocada a repousar até que as estruturas maiores (hifas e agregados de esporos) se depositassem no seu fundo. A seguir, adicionou-se 200 µL do sobrenadante a 1800 µL de RPMI-1640. Este tubo foi homogeneizado num agitador vortex durante 15 segundos e, posteriormente, a suspensão foi acertada para um valor de 80% a 82% de transmitância a 530 nm (que equivale a uma medição entre 0,09 a 0,11 no espetrofotómetro). Desta suspensão realizou-se uma diluição (1:50), adicionando 80 µL a 3920 µL de RPMI-1640, correspondendo, aproximadamente, a  $0,4 - 5 \times 10^4$  UFC/mL de suspensão. Esta suspensão constituiu a solução de trabalho do inóculo.

### **Preparação da placa**

Na Figura 1 encontra-se uma representação esquemática da placa para determinar a CMI do OE. Inicialmente, pipetou-se 200 µL do extrato previamente solubilizado para cada poço da linha A. De seguida, pipetou-se 100 µL de meio líquido para os poços da linha B até aos da linha F e realizaram-se, com uma pipeta multicanal, diluições sucessivas (1:2) do extrato solubilizado da linha A até F. Para se realizar a inoculação das estirpes, adicionou-se 100 µL da solução de trabalho do inóculo em todos os poços da linha A até F. O controlo positivo (linha G) corresponde a 100 µL de meio líquido com 100 µL da solução de trabalho do inóculo. O controlo negativo (linha H) corresponde a 200 µL de

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

meio líquido. Após inoculação, a placa foi colocada a incubar em estufa a 37 °C, durante 24 horas no caso das bactérias e 48 horas no caso dos fungos.

	Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Linha	Concentração (% v/v)	Estirpe 1		Estirpe 2		Estirpe 3		Estirpe 4		Estirpe 5		-	
A	2,50												
B	1,25												
C	0,63												
D	0,31												
E	0,16												
F	0,08												
G	Controlo positivo	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +	CRL +		
H	Controlo negativo	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -	CRL -		

**Figura 1** - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio para determinar a CMI.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- CRL + representa poço com meio de cultura líquido e respetivo inóculo;
- CRL - representa poço com meio de cultura líquido;
- Espaços a branco representam poços com o extrato diluído e o respetivo inóculo;
- Espaços a cinzento (colunas 11 e 12): poços que não foram utilizados para o ensaio.

### Considerações

Numa mesma placa, puderam ser testadas mais do que uma estirpe de bactérias, sempre que asseguradas as condições necessárias para a não ocorrência de contaminações cruzadas. Para os fungos filamentosos e leveduras com maior risco de ocorrer contaminações, foram processados de forma independente.

Inicialmente, foi realizado um ensaio de controlo ao DMSO nas concentrações utilizadas para emulsionar o OE com o objetivo de garantir que o crescimento de todas as estirpes não seria afetado.

### 3.1.3 Tratamento de Resultados

Para além da determinação do CMI, foi realizada uma análise para averiguar qual a concentração de extrato capaz de reduzir significativamente o crescimento microbiano.

Para isso, as absorvâncias de cada poço foram lidas a 600 nm num leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan) ao toh, t24h (para bactérias) e t48h (para fungos). Realizou-se uma média dos duplicados e descontou-se os valores das absorvâncias obtidas em toh às absorvâncias obtidas em t24h e t48h, para eliminar interferentes. Os resultados foram validados tendo em conta o controlo negativo (assegura a esterilidade do meio) e convertidos em percentagens de crescimento microbiano normalizadas ao controlo positivo (máximo crescimento do microrganismo), estão expressos em função dos valores médios  $\pm$  DP (desvio padrão) de pelos menos 2 ensaios independentes.

O tratamento dos resultados foi realizado através de folhas de cálculo programadas em Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365). A construção dos gráficos foi realizada por meio do programa informático GraphPad Prism (versão 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA).

## **3.2. Atividade citotóxica**

### **3.2.1. Linhas celulares**

Para a análise da atividade citotóxica do OE de *E. globulus*, foram utilizadas duas linhas celulares de ratinho: fibroblastos (linha celular NIH/3T3; ATCC CRL-1658), e macrófagos (linha celular RAW 264.7; ATCC®, TIB -71™).

As linhas celulares foram cultivadas em *T-flasks* de 75 cL com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com glucose, bicarbonato de sódio, penicilina, estreptomicina e soro fetal bovino (FBS) inativado, no caso dos fibroblastos, ou não inativado, no caso dos macrófagos. As culturas eram passadas de três em três dias, ou sempre que se aproximavam da confluência, e incubadas numa estufa a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>, conforme instruções descritas pela ATCC e detalhadas na secção 3.2.3.

### **3.2.2. Reagentes**

- **Meio completo** – meio DMEM (Life technologies) suplementado com 25 mM de glucose (Sigma-Aldrich®), 35,9 mM (fibroblastos)/17,95 mM (macrófagos) de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10% v/v de FBS inativado (fibroblastos)/ FBS não inativado (macrófagos) (Life technologies), utilizado como meio de cultura para as células;

- **Azul tripano** (Merk®) – corante de células vivas usada para contagem celular através da câmara de *Neubauer*;
- **MTT** (metiltiazolildifenil-tetrazolio bromido) (Alfa Aesa®) – utilizado para medir a viabilidade das células;
- **Isopropanol** (FisherChemical) – utilizado para solubilizar os cristais azuis escuros de formazano formados;
- **DMSO** (FisherChemical) – emulsionante do OE em meio de cultura aquoso;
- **Solução de protease com tripsina a 0,05% m/v e EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) a 0,2 g/L** ((HyClone™) – solução utilizada para os fibroblastos se soltarem da parede do frasco;
- **SDS** (Dodecilsulfato de Sódio) (PanReac AppliChem) – utilizado no controlo positivo de citotoxicidade;
- **PBS (solução salina com tampão fosfato)** – 1.37 M de NaCl (FisherChemical) com 27 mM de KCl (ChemLab), 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (FisherChemical) e 20 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ChemLab), utilizado para lavagem das células para remoção de vestígios de meio de cultura, durante o processo de tripsinização e preencher os poços das placas de 96 poços que não eram utilizados no ensaio.

### 3.2.3. Determinação da Citotoxicidade *in vitro*: Ensaio MTT

A atividade citotóxica do extrato nos fibroblastos e macrófagos de ratinho foi determinada *in vitro* de acordo com o ensaio MTT descrito na norma **ISO/EN 10993-5 - Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, com algumas modificações [26].

### **Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços**

- **Fibroblastos** (NIH/3T3; ATCC CRL-1658)

As células cultivadas em *T-flasks* foram utilizadas para o ensaio assim que se mostraram confluentes (~80%). Para isso, o meio completo existente no frasco de cultura foi descartado, foi feita uma lavagem com PBS para remoção de vestígios de meio de cultura, e adicionou-se 3 mL de uma solução de tripsina a 0,05% m/v e EDTA a 0,2 g/L, para que as células se soltassem do frasco. De seguida, adicionou-se 7 mL de meio completo para neutralizar a ação da tripsina. Esta mistura de células, meio completo e tripsina foi transferida para um tubo de *falcon* de 15 mL e centrifugada a 250 RCF (Força Centrífuga Reativa), durante 5 minutos. Após a centrifugação, rejeitou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspendido em 10 mL de meio completo. De seguida, retirou-se 10 µL

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

da suspensão celular para um *eppendorf* com 10  $\mu\text{L}$  do corante azul tripano (usado como marcador de células viáveis para contagem na câmara de *Neubauer*). A concentração de células viáveis por mL de solução foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\text{Concentração de células } \left( \frac{\text{células}}{\text{mL}} \right) \\ = \text{média das células após contagem dos 4 quadrantes} \times 2(\text{fator diluição}) \times 10^4$$

Com o valor da concentração de células, a suspensão celular foi diluída em meio completo para que a placa tivesse uma densidade celular de  $1 \times 10^4$  células/poço. Em cada poço foi colocado 100  $\mu\text{L}$  da suspensão de células preparada anteriormente e a placa foi colocada a incubar durante 24 horas, a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5% de  $\text{CO}_2$ , permitindo a adesão das células ao fundo do poço.

- **Macrófagos** (RAW 264.7; ATCC®, TIB -71™)

Para os macrófagos, o procedimento de preparação da placa é bastante semelhante ao descrito anteriormente para os fibroblastos, com algumas alterações:

- Inicialmente após se retirar o meio completo, adicionou-se 10 mL de meio completo novo e utilizou-se um raspador, para que as células se soltassem da parede to *T-flask*, não sendo necessário a utilização da solução de tripsina com EDTA;
- A placa foi cultivada com uma densidade celular de  $2,5 \times 10^4$  células/poço.

### **Preparação dos estímulos e estimulação das células**

Para se realizar o ensaio com um composto oleoso é necessário adicionar um emulsionante para que se assegure a solubilização do OE no meio de cultura aquoso durante todo o ensaio. Neste sentido, foi utilizado o DMSO como emulsionante na mesma proporção que o OE. Foram preparadas soluções com meio de cultura, DMSO e OE de *E. globulus* pelo método de diluições sucessivas em *eppendorfs* de 1,5 mL. Adicionalmente, preparou-se uma solução de DMSO a 2,5% v/v (controlo de solvente) e uma solução de SDS a 2% (v/v). Realizou-se também um ensaio controlo com várias concentrações de DMSO. As concentrações testadas de OE e de DMSO encontram-se na Tabela 4.

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

**Tabela 4** - Resumo das concentrações utilizadas para testar a atividade citotóxica.

Composto	Linha Celular	Gama de concentrações em teste (% v/v)
OE de <i>E. globulus</i>	Fibroblastos	2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02 e 0,01
	Macrófagos	
DMSO	Fibroblastos	2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04 e 0,02
	Macrófagos	2,00; 1,00; 0,50; 0,25; 0,13; 0,06; 0,03; 0,02 e 0,01

Após o período de incubação e da preparação dos estímulos, o meio completo foi removido de cada poço e descartado com cuidado para que as células permanecessem aderidas ao fundo. Aos poços reservados, foram adicionados 100 µL dos respetivos estímulos. Para o controlo do solvente adicionou-se a solução preparada com DMSO. Para o controlo negativo adicionou-se 100 µL de meio completo e para o controlo positivo adicionou-se 100 µL de SDS a 2% (v/v). Na Figura 2 encontra-se um esquema da placa de 96 poços para este ensaio. A placa foi colocada a incubar durante 24 horas, a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
		Concentração (% v/v)										
Linha		2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	S	C	M	
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figura 2** - Representação esquemática da placa de 96 poços no ensaio MTT.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- Espaços a branco:
  - Colunas 2 a 8 – Poços com o extrato diluído e células;
  - Coluna 9 (S) – Controlo do solvente (DMSO);
  - Coluna 10 (C) – Controlo negativo, corresponde às células em meio completo;
  - Coluna 11 (M) – Controlo positivo, corresponde às células expostas a SDS 2% (v/v).

- Espaços a cinzento representam os poços com PBS que não foram utilizados para o ensaio.

### **Execução do ensaio MTT**

Após o período de incubação das células com os estímulos, removeu-se o conteúdo de todos os poços e fez-se uma lavagem com 150  $\mu$ L de PBS, de forma a remover todos os vestígios de OE para que não ocorresse nenhuma reação com o MTT [27]. Após a remoção do PBS, foram adicionados, no escuro, 100  $\mu$ L do composto MTT (1 mg/mL em meio incompleto) a cada poço de ensaio e de controlo. A placa foi colocada a incubar, revestida em papel de alumínio, durante 4 horas a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

Após este período de incubação, a solução de cada poço foi removida e descartada com cuidado para que os cristais de formazano não fossem aspirados. De seguida, adicionou-se 100  $\mu$ L de isopropanol a cada poço e, com uma pipeta multicanal, ressuspendeu-se o conteúdo dos poços de forma a promover a dissolução dos cristais de formazano. Por fim, as absorvâncias foram lidas a 570 nm e 690 nm, no leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan).

### **3.2.4. Tratamento dos Resultados**

O tratamento dos resultados foi realizado através de folhas de cálculo em Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365), e consistiu nos seguintes passos:

1. Absorvâncias: Aos valores de absorvância medidos a 570 nm, para cada concentração teste e para cada controlo, foram subtraídos os respetivos valores de absorvância medidos a 690 nm;
2. Calcular a percentagem de viabilidade celular: Cada valor de absorvância obtido no ponto 1 foi multiplicado por 100 e dividido pela média dos valores de absorvância do controlo negativo obtidos no ponto 1. Estes valores representam a percentagem de viabilidade celular. Os resultados da viabilidade celular das células em OE de *E. globulus* estão expressos em função dos valores médios  $\pm$  DP de 3 ensaios independentes. As concentrações que prejudicam a viabilidade celular em mais de 30%, quando comparadas com o controlo negativo, foram consideradas citotóxicas.
3. Calcular o IC<sub>50</sub>: Foi calculada a média de percentagem de viabilidade celular para cada concentração do extrato e fez-se uma transformação logarítmica das concentrações. A estes valores, foi ajustada uma curva sigmoidal no GraphPad

Prism (versão 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA). A partir desta curva, foram calculados os valores de IC<sub>50</sub>.

4. Construção de um gráfico de barras e análise estatística: Com os valores de percentagem de viabilidade celular, obtidos no ponto 2, e com as concentrações de extrato, foi contruído um gráfico de barras e realizada uma análise estatística *t*-Test, no GraphPad Prism (versão 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA).

### 3.3. Atividade anti-inflamatória

#### 3.3.1. Reagentes

- **Meio completo** – meio DMEM (Life technologies) suplementado com 25 mM de glucose (Sigma-Aldrich®), 17,95 mM de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®) e 10% v/v de FBS não inativado (Life technologies), utilizado como meio de cultura para as células;
- **Azul tripano** (Merk®) – marcador de células vivas para contagem na câmara de *Neubauer*;
- **DMSO** (FisherChemical) – emulsionante do OE em meio de cultura aquoso;
- **PBS** – 1.37 M de NaCl (FisherChemical) com 27 mM de KCl (ChemLab), 100 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (FisherChemical) e 20 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (ChemLab), utilizado para lavar os frascos de cultura durante passagens, mudanças de meio e preencher os poços não utilizados no ensaio;
- **LPS** (Sigma-Aldrich®) – utilizado para induzir um estímulo inflamatório nos macrófagos, provocando um aumento na de produção celular de NO;
- **SNAP** (*S-Nitroso-N-acetylpenicillamine*) (Biogen, Tocris) – dador de NO para o ensaio de *scavenging activity*;
- **Reagente de Griess** – mistura de sulfanilamida a 1% (m/v) (Sigma-Aldrich®) em ácido fosfórico a 5% (v/v) (Sigma-Aldrich®) com N-1-natfilenodiamina a 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich®). Utilizado para a quantificação do NO através de uma reta de calibração.

### **3.3.2. Avaliação da produção de NO**

Neste sentido, avaliou-se a produção de NO em macrófagos de ratinho (linha celular RAW 264.7; ATCC®, TIB -71™) sujeitos a um estímulo inflamatório (LPS) na presença do extrato para determinar o seu potencial anti-inflamatório.

#### **Tratamento das células e preparação da placa de 96 poços**

Este procedimento decorreu tal como já foi referido anteriormente para os macrófagos na análise da atividade citotóxica. A placa de 96 poços foi cultivada com uma densidade celular de  $1 \times 10^5$  células/poço e colocada a incubar durante 24 horas, a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **Preparação dos estímulos e estimulação das células**

Para a realização deste ensaio utilizou-se o DMSO como emulsionante do OE. De acordo com os resultados obtidos na análise da atividade citotóxica consideraram-se as seguintes concentrações de OE de *E. globulus* a ser testadas (% v/v): 0,08; 0,04; 0,02 e 0,01, correspondendo a uma gama de concentrações biocompatíveis. Adicionalmente, preparou-se uma solução intermédia de LPS em PBS numa concentração de 10 µg/mL e uma solução de DMSO a 0,08% v/v.

Após o período de incubação e da preparação dos estímulos, o meio completo foi removido de cada poço e descartado com cuidado para que as células permanecessem aderidas ao fundo. Aos poços reservados, foram adicionados 100 µL dos respetivos estímulos. Para o controlo do solvente adicionou-se a solução preparada com DMSO e para o controlo com e sem LPS adicionou-se 100 µL de meio completo. Por fim, adicionou-se 10 µL de LPS a cada poço (1 µg/mL) exceto nos poços que correspondem ao controlo sem LPS. Na Figura 3 encontra-se uma representação esquemática da placa de 96 poços na avaliação da produção de NO.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Concentração (% v/v)											
Linha		0,08	0,04	0,02	0,01	S	C+LPS	C+LPS		C-LPS	C-LPS	
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

**Figura 3** - Representação esquemática da placa de 96 poços na avaliação da produção de NO.

Legenda:

- Contorno a negrito representa a placa de 96 poços;
- Espaços a branco:
  - Colunas 2 a 5 – Poços com o extrato diluído, células e LPS;
  - Coluna 6 (S) – Controlo do solvente (DMSO + LPS);
  - Colunas 7 e 8 (C+LPS) – Controlo com LPS, corresponde às células em meio completo e LPS;
  - Colunas 10 e 11 (C-LPS) – Controlo sem LPS, corresponde às células em meio completo para avaliar a produção basal de NO.
- Espaços a cinzento representam os poços com PBS que não foram utilizados para o ensaio.

### Ensaio colorimétrico de Griess

Neste ensaio utilizou-se o reagente de Griess, para avaliar os níveis de metabolitos estáveis de NO, que foi preparado misturando a mesma quantidade de reagente A - sulfanilamida 1% (m/v) em ácido fosfórico 5% (v/v) com reagente B - N-1-natfilenodiamina 0,1% (m/v) em H<sub>2</sub>O).

Após o período de incubação da placa, foram recolhidos 100 µL do sobrenadante de cada poço para uma nova placa e adicionou-se 100 µL do reagente de Griess. A placa foi colocada a incubar, revestida em papel de alumínio, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Por fim, leu-se a absorvância a 550 nm, no leitor de microplacas (Biorad, Tokyo Japan). A concentração de metabolitos estáveis de NO presente em cada poço foi determinada através de uma reta de calibração de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>).

### **3.3.3. Scavenging activity**

Este ensaio realiza-se caso exista uma diminuição da produção de NO e permite confirmar se a redução determinada no ensaio *in vitro* é devida a uma redução da produção celular de NO ou, em alternativa, da possível capacidade *scavenging* do próprio extrato. É um ensaio sem células.

Para este ensaio, foram testadas as seguintes concentrações de OE de *E. globulus* (% v/v): 2,50; 1,25; 0,63; 0,31; 0,16; 0,08; 0,04; 0,02 e 0,01. Utilizou-se o DMSO como agente emulsionante. Foi preparada uma solução do DMSO a 2,50% v/v e uma solução de SNAP (dador de NO) a 300 µM.

Numa linha da placa de 96 poços, foram pipetados 300 µL de meio completo em dois poços (controlos), 300 µL da solução preparada de DMSO num poço e 300 µL de cada concentração a ser testada para cada poço restante dessa mesma linha. De seguida, a cada poço adicionou-se 1,1 µL de SNAP, exceto no poço correspondente ao controlo sem SNAP, e incubou-se durante 3 horas a uma temperatura de 37°C. Após o período de incubação dividiu-se o conteúdo de cada poço (300 µL) em três, obtendo-se assim um triplicado (100 µL em cada poço). Por fim, adicionou-se 100 µL de reagente de Griess a cada poço e após 30 minutos leu-se a absorbância a 550 nm. Na Figura 4 encontra-se uma representação esquemática de metade da placa de 96 poços após a realização do triplicado para o ensaio da *Scavenging activity*.

Coluna	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Concentração (% v/v)											
Linha	2,50	1,25	0,63	0,31	0,16	0,08	0,04	0,02	0,01	S	C+SNAP	C-SNAP
A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
C	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
D												

**Figura 4** - Representação esquemática de metade da placa de 96 poços após a realização do triplicado para o ensaio da *Scavenging activity*.

Legenda:

- Contorno a negrito representa metade da placa de 96 poços;
- Colunas 1 a 9 – Poços com o extrato diluído, e SNAP;
- Coluna 10 (S) – Controlo do solvente (DMSO + SNAP);
- Coluna 11 (C+SNAP) – Controlo com SNAP, corresponde aos poços com meio completo e SNAP;
- Coluna 12 (C-SNAP) – Controlo sem SNAP, corresponde aos poços com apenas meio completo para avaliar os valores de nitritos basais no meio de cultura;
- Espaços a cinzento: quantidade em  $\mu\text{L}$  presente em cada poço após a realização do triplicado.

### 3.3.4. Tratamento dos Resultados

Na avaliação da produção de NO, os resultados estão expressos em função dos valores médios  $\pm$  DP de 4 ensaios independentes e foram normalizados como percentagem do “Controlo + LPS”. Um controlo sem LPS também foi incluído para avaliar a produção basal de NO.

Na avaliação da capacidade do OE de *E. globulus* captar o NO cedido pelo dador SNAP, os resultados estão expressos em função dos valores médios  $\pm$  DP e foram normalizados como percentagem do “Controlo + SNAP”. Foi incluído um controlo sem SNAP para avaliar os valores de nitritos basais no meio de cultura.

O tratamento dos resultados foi realizado através de folhas de cálculo em Excel (Microsoft® Excel® para Microsoft 365). A construção dos gráficos e a análise estatística *t*-Test foi realizada por meio do programa informático GraphPad Prism (versão 9.0.0 para Windows, GraphPad Software, La Jolla Califórnia, EUA).

## 4. Resultados

### 4.1. Atividade antimicrobiana

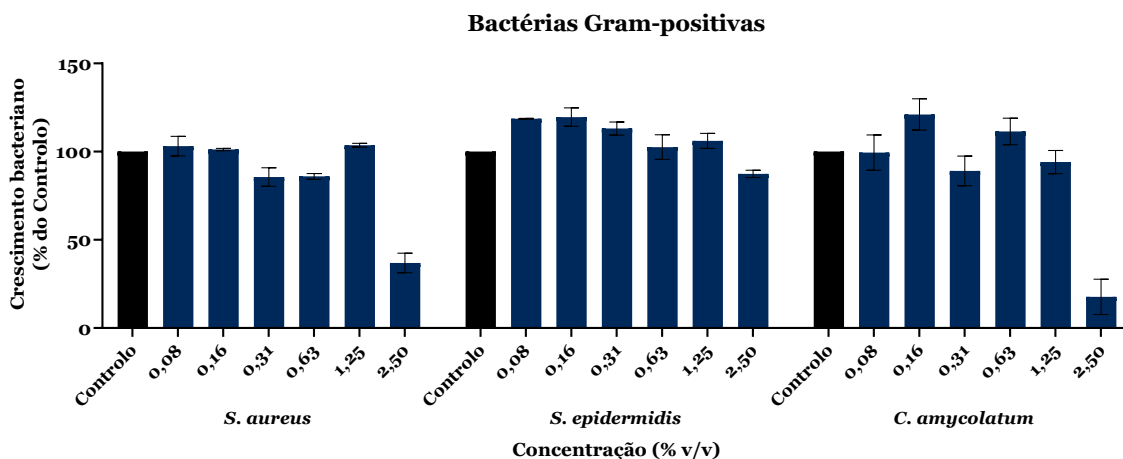
A atividade antimicrobiana foi avaliada através do estudo do comportamento de sete estirpes de microrganismos, três bactérias Gram-positivas, duas bactérias Gram-negativas e dois fungos, quando expostos ao óleo essencial.

Na Tabela 5 podemos verificar que, por observação direta da placa de 96 poços, se conseguiu determinar a CMI visual para as espécies *S. aureus*, *C. amycolatum*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*, na concentração 2,50 % v/v, onde não se visualizou turvação do meio. Para os restantes microrganismos (*S. epidermidis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) não se conseguiu visualizar a ausência de turvação no meio, para a gama de concentrações testadas, não apresentando CMI visual.

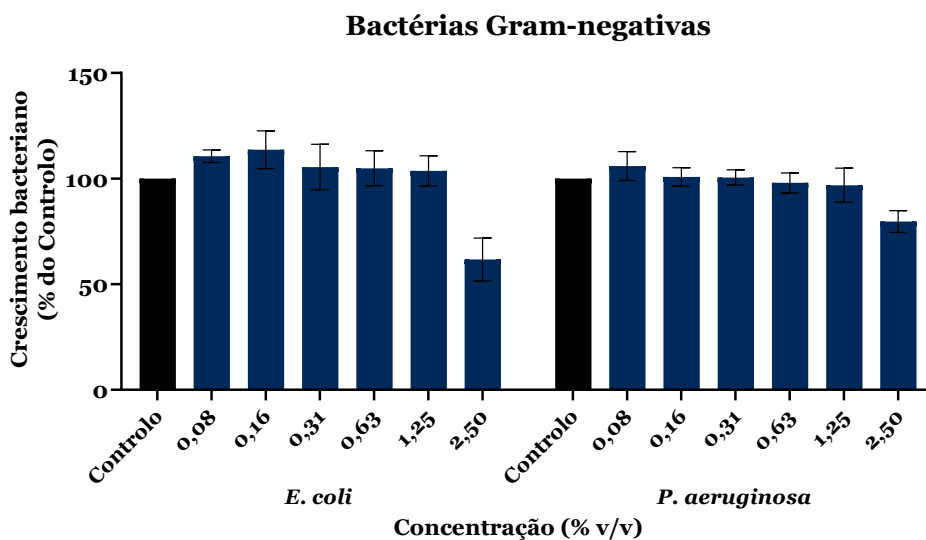
De acordo com a Figura 5, observamos que na concentração de 2,50% v/v há uma redução de, aproximadamente, 60% e 80% do crescimento das bactérias *S. aureus* e *C. amycolatum*, respetivamente, quando comparados com o controlo. Para o *S. epidermidis* há uma redução no seu crescimento em cerca de 10%, na concentração mais elevada. Nas restantes concentrações do extrato testadas, o crescimento das bactérias Gram-positivas, variou entre 90% e 120% quando comparados com o controlo.

Relativamente às bactérias Gram-negativas, apenas se verificou inibição do crescimento na concentração mais elevada testada (2,50% v/v), em 40% para a *E. coli* e em 20% para a *P. aeruginosa* (Figura 6). Nas restantes concentrações não ocorreu inibição do crescimento.

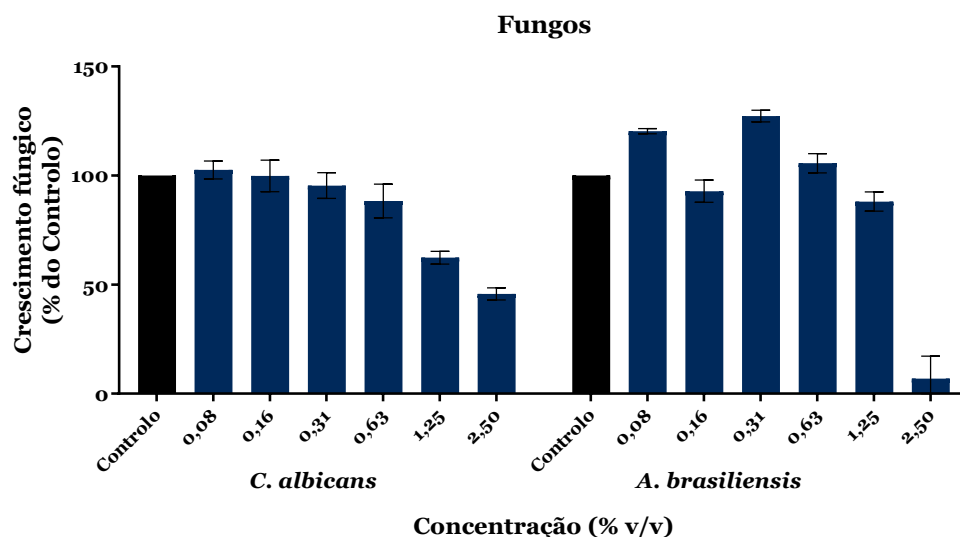
Para a *C. albicans* verificamos que existe uma inibição do crescimento da levedura de 55%, 40% e 10% nas concentrações de 2,50, 1,25 e 0,63% v/v, respetivamente (Figura 7). No entanto, a inibição do crescimento do *A. brasiliensis* apenas é considerável na concentração mais elevada do OE de *E. globulus*, com uma redução em 90%, quando comparado com o controlo (Figura 7).



**Figura 5** – Crescimento bacteriano (% do Controlo) de bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. amycolatum*) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde às bactérias expostas ao meio de cultura bacteriano sem a presença do extrato.



**Figura 6** - Crescimento bacteriano (% do Controlo) de bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*) após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde às bactérias expostas ao meio de cultura bacteriano, sem a presença do extrato.



**Figura 7** - Crescimento fúngico (% do Controlo) de *C. albicans* e *A. brasiliensis* após 48 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde aos fungos expostos ao meio de cultura fúngico, sem a presença do extrato.

**Tabela 5** - Valores da CMI (% v/v) do OE de *E. globulus* na análise da atividade antimicrobiana.

Espécie de bactéria	Estirpe	CMI (% v/v)
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	2,50
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 178970	-
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	ATCC 49368	2,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	-
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	-
Espécie de Fungo	Estirpe	Classificação
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	2,50
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 1604	2,50

## 4.2. Atividade citotóxica

Os nossos resultados demonstram que, para a maioria das concentrações testadas do OE (2,50-0,04% v/v), existe uma diminuição significativa da atividade metabólica nos fibroblastos quando comparadas com o controlo negativo (Figura 8). Apenas nas menores concentrações (0,02 e 0,01% v/v) é que não existem diferenças significativas. A partir da concentração 0,04% v/v até 0,01% v/v, o extrato foi considerado biocompatível com esta linha celular, pois apresenta uma percentagem de viabilidade celular acima de 70%, quando comparada com o controlo.

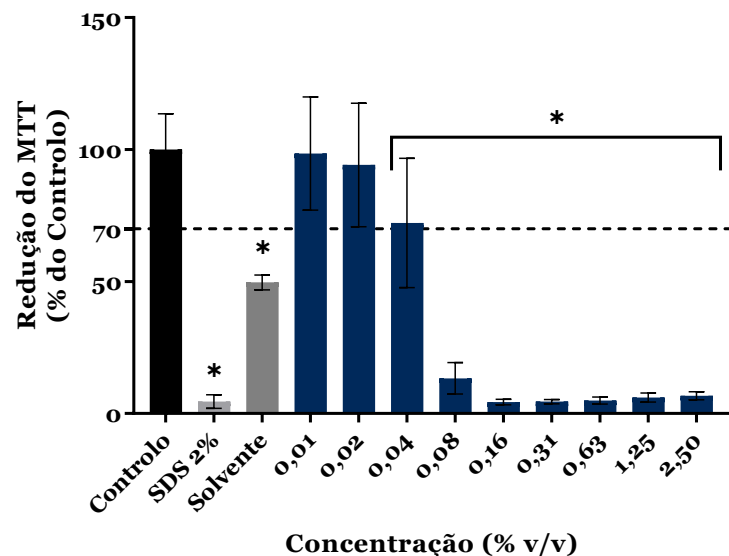
Relativamente aos macrófagos, estes apresentam uma redução significativa da viabilidade celular para a maioria das concentrações testadas do OE (2,50 - 0,02% v/v), sendo o extrato considerado biocompatível na gama de concentrações 0,04 - 0,01% v/v por apresentar uma percentagem de viabilidade celular acima de 70% quando comparada com o controlo (Figura 9).

Observa-se também, que na concentração 0,08% v/v do OE, os macrófagos apresentam maior atividade metabólica quando comparados aos fibroblastos na mesma concentração (Figura 8 e Figura 9), sendo mais resistentes à ação citotóxica do OE. Este resultado é também corroborado pelo menor IC<sub>50</sub> obtido para os fibroblastos quando comparado com o obtido para os macrófagos (Tabela 6).

Relativamente ao DMSO, solvente usado para promover a dissolução do OE no meio de cultura, não se observam alterações significativas nas menores concentrações tanto nos fibroblastos (0,31 - 0,02% v/v) como nos macrófagos (0,13 - 0,01% v/v). Na Figura 10 consegue-se verificar que a partir da concentração 1,25% v/v os fibroblastos apresentam uma viabilidade celular acima de 70% sendo assim estas concentrações de DMSO (1,25 - 0,02% v/v) biocompatíveis com a linha celular 3T3. No entanto, nos macrófagos apenas se observa biocompatibilidade na gama de concentrações 0,50 - 0,01% v/v (Figura 11).

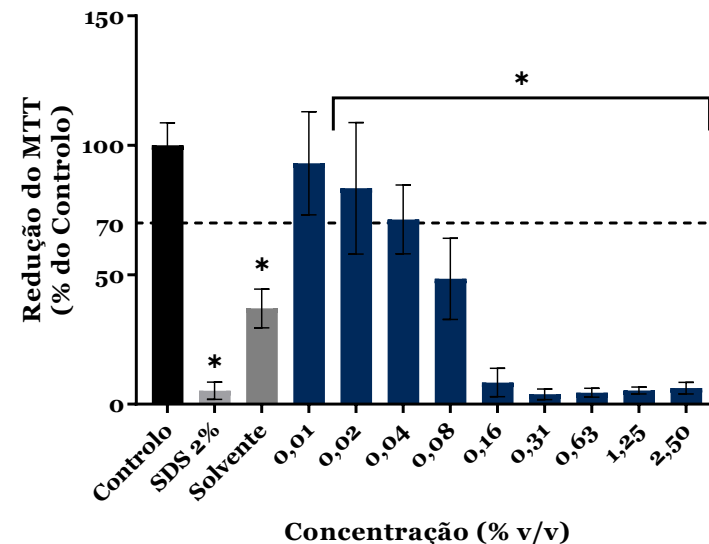
Na Tabela 7 encontra-se um resumo das concentrações (% v/v) do extrato e do DMSO consideradas biocompatíveis com as linhas celulares em estudo.

**Viabilidade celular das células 3T3 em OE de *E. globulus***



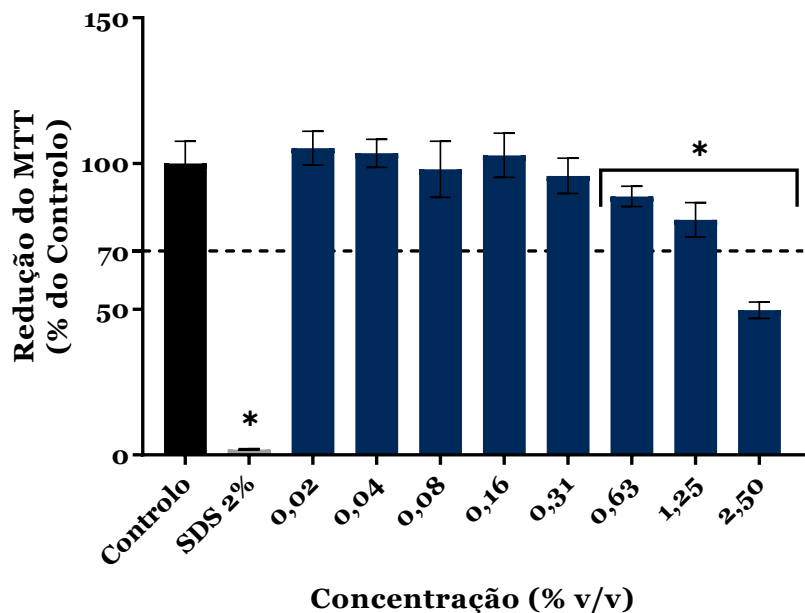
**Figura 8** - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células 3T3 após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO a 2,50% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

**Viabilidade celular das células RAW em OE de *E. globulus***



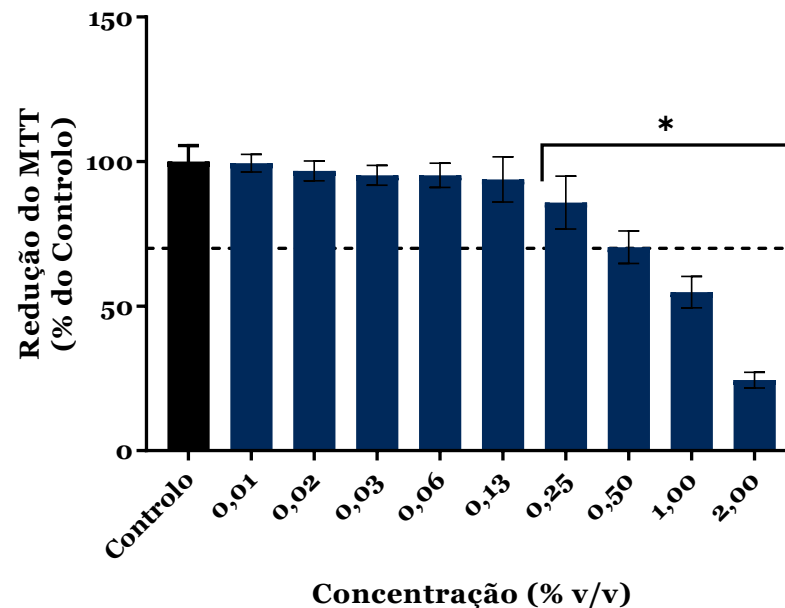
**Figura 9** - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células RAW após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de óleo essencial de *Eucalyptus globulus*. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO a 2,50% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

**Viabilidade celular das células 3T3 em DMSO**



**Figura 10** - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células 3T3 após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de DMSO. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

**Viabilidade celular das células RAW em DMSO**



**Figura 11** - Redução do MTT (% do controlo) representa a viabilidade celular das células RAW após 24 horas em contacto com diferentes concentrações de DMSO. “Controlo” corresponde a células expostas a meio de cultura completo. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo” calculadas por meio de análise estatística *t*-Test.

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

**Tabela 6** – Valores de IC<sub>50</sub> (% v/v) para cada uma das linhas celulares (3T3 e RAW) na presença do OE de *E. globulus*.

Linha celular	IC <sub>50</sub> (% v/v)	Intervalo de Confiança a 95% (% v/v)	R <sup>2</sup>
3T3	0,04934	0,04460 a 0,05456	0,8954
RAW	0,07846	0,06799 a 0,08853	0,8834

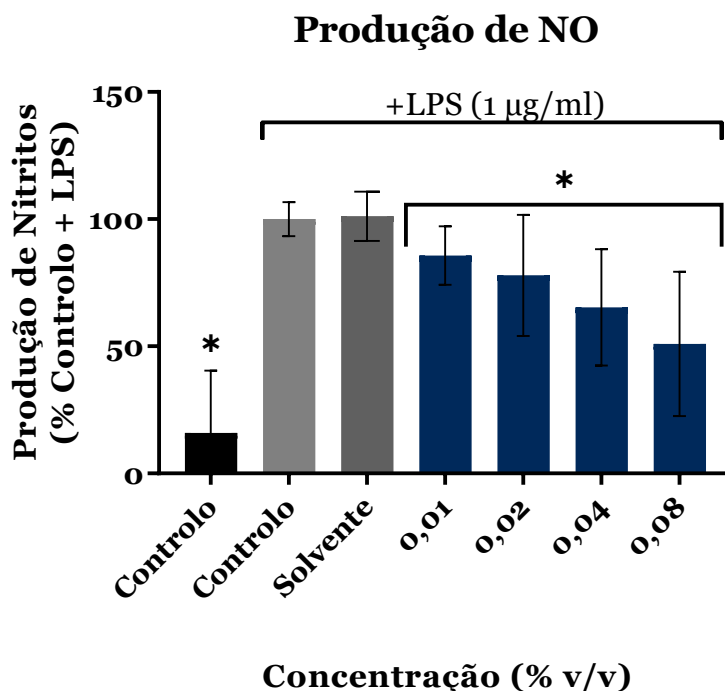
**Tabela 7** – Concentrações biocompatíveis do OE de *E. globulus* e do DMSO para os fibroblastos (3T3) e macrófagos (RAW).

Composto	Concentração biocompatível (% v/v)	
	3T3	RAW
OE de <i>E. globulus</i>	≤0,04	≤0,04
DMSO	≤1,25	≤0,50

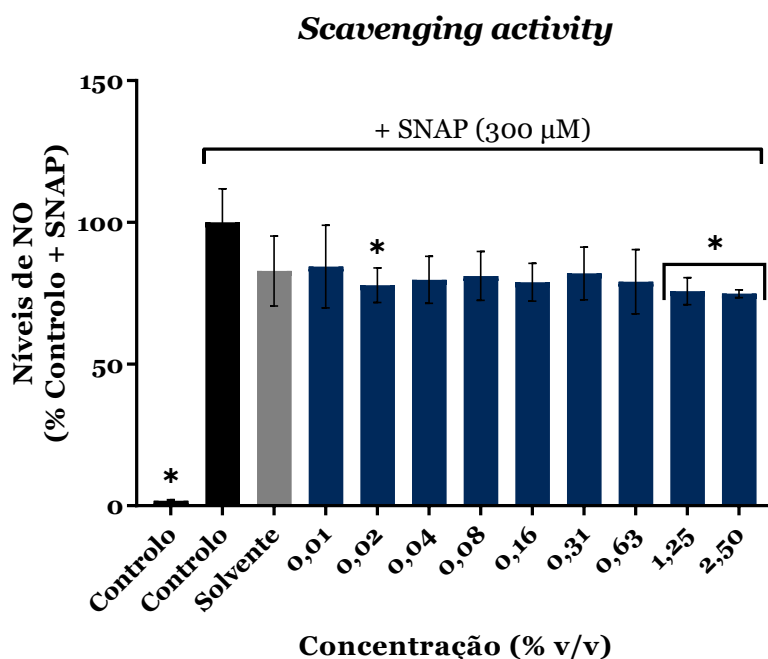
### 4.3. Atividade anti-inflamatória

Os nossos resultados mostraram que após o estímulo com LPS, houve uma redução significativa da produção de NO pelos macrófagos, quando expostos ao OE de *E. globulus*, em comparação com o controlo com LPS (Figura 12). Com o aumento da concentração verifica-se um aumento na diminuição da produção de NO, diminuição esta que variou entre 15% a 50%. Na primeira concentração biocompatível com os macrófagos (0,04% v/v) verifica-se uma redução de, aproximadamente, 35%.

Como se verificou uma redução na produção de NO pelos macrófagos, realizou-se um ensaio de atividade *Scavenging*. Na Figura 13, podemos observar que apenas existem alterações significativas nas concentrações 0,02, 1,25, 2,50% v/v. Na maior concentração do extrato (2,50% v/v) ocorreu uma diminuição em cerca de 25% de NO no meio, quando comparado com o controlo.



**Figura 12** - Efeito do OE de *Eucalyptus globulus* na produção de NO pelos macrófagos após a estimulação com LPS. As células foram expostas a meio completo ou a diferentes concentrações do extrato durante 24 horas na presença de LPS (1 µg/mL). “Solvente” corresponde a células expostas a DMSO a 0,08% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo + LPS” calculadas por meio de análise estatística t-Test.



**Figura 13** – Capacidade *scavenging* de NO do OE de *Eucalyptus globulus*. Os resultados estão expressos como percentagem de libertação de NO desencadeada pelo SNAP. “Solvente” corresponde a DMSO a 2,50% v/v que representa o efeito do solvente na maior concentração testada. “\*” – Diferenças significativas relativamente ao “Controlo + SNAP” calculadas por meio de análise estatística t-Test.

## 5. Discussão Geral

Neste estudo, a atividade antimicrobiana do OE de *E. globulus* foi determinada pelo método de microdiluição em três bactérias Gram-positivas (*S. aureus*, *S. epidermidis* e *C. amycolatum*), duas bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa* e *E. coli*) e dois fungos (*C. albicans* e *A. brasiliensis*). A CMI deste extrato foi determinada em 2,50% v/v para os fungos (*C. albicans* e *A. brasiliensis*), e para as bactérias *S. aureus* e *C. amycolatum* (Tabela 5). Para as restantes estirpes apenas na *E. coli* se encontra uma redução do crescimento em cerca de 40 % também na concentração de 2,50% v/v (Figura 6).

Verificámos que o óleo essencial de *E. globulus* possui atividade antimicrobiana, reduzindo o crescimento microbiano especificamente contra *C. albicans* e *A. brasiliensis*. A *C. albicans* é uma levedura responsável por diferentes tipos de infeções, como infeções na mucosa oral e vaginal e infeções sistémicas [28]. O OE de *E. globulus* é um bom inibidor deste microrganismo, tendo já sido reportado noutros estudos [29]. A aspergilose é uma infeção causada por *Aspergillus spp.*, em pessoas com o sistema imunitário comprometido ou com distúrbios pulmonares. O OE de *E. globulus* mostrou ser eficaz na inibição do crescimento dos fungos do género *Aspergillus*. Além disso, a constituição deste óleo pode influenciar a atividade antifúngica, sendo que o 1,8-cineol pode não ser o principal constituinte eficaz na inibição do crescimento destes microrganismos [30]. Num estudo realizado por Hendry et al (2009), com o objetivo de investigar as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de eucalipto e do seu principal componente, o 1,8-cineol, sozinho e em combinação com clorexidina, verificaram que o 1,8-cineol apresenta uma atividade antimicrobiana inferior à do óleo de eucalipto em vários microrganismos, realçando a importância do sinergismo que os vários componentes do óleo apresentam [31].

Entre as bactérias Gram-positivas testadas, o OE de *E. globulus* é mais ativo contra um patogénico da pele, *C. amycolatum* do que contra espécies representativas da microbiota da pele, *S. aureus* e *S. epidermidis* e bactérias Gram-positivas. Nos últimos anos, o interesse pelo *C. amycolatum* tem aumentado devido ao aparecimento de resistências nesta espécie causadora de distúrbios na pele em doentes imunocomprometidos, sendo por isso interessante o potencial deste OE no tratamento de infeções causadas por este microrganismo [32].

Apesar de ser menos ativo contra o *S. aureus*, o OE mostrou-se capaz de inibir o crescimento desta bactéria, sendo a CMI a 2,50% v/v. Na *E. coli*, não se verificou a

presença da CMI, mas existe uma inibição considerável do crescimento a 2,50% v/v, em cerca de 40%. Diversos estudos já verificaram o potencial que este OE apresenta contra estes dois microrganismos, não sendo concordante em qual destes é mais ativo [33], [34]. Nestas situações, a variabilidade da composição do OE de *E. globulus*, que pode ser afetada por diversos fatores exógenos e endógenos, pode causar alterações na bioatividade do extrato, justificando assim esta diferença entre estudos [35].

Relativamente às restantes estirpes, o OE não se mostrou ser muito ativo nas concentrações testadas, o que pode indicar que não seja o mais indicado como possível conservante em preparações cosméticas, apesar de poder ter um efeito adjuvante do sistema conservante nas espécies para os quais é ativo. No entanto, mostrou ter uma atividade antimicrobiana interessante contra a *C. albicans*, *A. brasiliensis*, *C. amycolatum*, *S. aureus* e *E. coli*, reduzindo consideravelmente o crescimento destes microrganismos. Desta forma, a aplicação deste OE poderá ser interessante contra patologias causadas por estas espécies, podendo no futuro ser utilizado como alternativa ou coadjuvante a antibióticos ou antifúngicos.

Os mecanismos de inibição do OE em microrganismos, ainda não são completamente conhecidos. No entanto, existem estudos que determinam os efeitos fisiológicos dos óleos essenciais e dos seus constituintes, tentando compreender como estes mecanismos funcionam. Um local importante de ação é a membrana celular. Muitos constituintes dos óleos essenciais foram propostos atuar sobre a membrana celular. A interação de compostos antimicrobianos com a membrana pode afetar o transporte de nutrientes e iões, o potencial da membrana, e a permeabilidade da célula [36].

Relativamente à atividade citotóxica, através dos perfis de inibição do óleo essencial, podemos verificar que este exerce um efeito citotóxico dependente da concentração para ambas as linhas celulares (Figura 8 e 9). Além disso, podemos considerar o extrato citotóxico para a maioria das concentrações testadas, tanto nos fibroblastos como nos macrófagos. Os resultados do DMSO em ambas as linhas celulares, mostram-nos que nas concentrações mais elevadas (3T3: 2,50% v/v; RAW: 1,00 e 2,00% v/v) este composto é citotóxico (Figura 10 e Figura 11). No entanto, podemos verificar que o potencial citotóxico do extrato nas linhas celulares é muito superior ao do DMSO nessas concentrações, o que nos leva a concluir que a citotoxicidade obtida poderá dever-se ao extrato em si e não ao composto usado para a sua solubilização. (Figura 8 e Figura 9).

A atividade citotóxica de um extrato é maior quanto menor for a concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular da linha celular em estudo (IC<sub>50</sub>). Assim, conseguimos perceber que a linha celular 3T3 (fibroblastos) é mais sensível à exposição do óleo por apresentar menor valor de IC<sub>50</sub> (3T3: IC<sub>50</sub> = 0,04934 % v/v) do que a linha celular RAW (macrófagos) (RAW: IC<sub>50</sub> = 0,07846 % v/v) (Tabela 6).

Num estudo realizado por Khazraei et al (2021), verificou-se que existe uma citotoxicidade elevada nas concentrações mais elevadas (0,5% e 5%) deste OE em fibroblastos humanos, onde os autores concluem não ser aconselhável o uso deste extrato nestas concentrações [37]. No entanto, num estudo realizado por Orchard et al (2018), com o objetivo de determinar a atividade antimicrobiana e citotoxicidade de 23 óleos essenciais diferentes combinados com 6 óleos de veiculação ( de *Aloe vera*, *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, *Persea americana*, *Prunus armeniaca* e *Simmondsia chinensis*) verificou-se que na combinação destes óleos existe a possibilidade da diminuição da citotoxicidade do extrato e mantém-se ou potencia-se a atividade antimicrobiana [38]. Deste modo, a combinação do OE de *E. globulus* com outros óleos de veiculação, poderá ser uma alternativa à elevada citotoxicidade que este óleo apresenta nas concentrações com atividade antimicrobiana.

Os OE de *E. globulus* disponíveis no mercado, referem que a aplicação na pele pode-se fazer diretamente (concentração de 100% v/v), ou diluído em várias gotas de óleo vegetal (Tabela 2). No caso do Blossom Essence® – Óleo essencial de *Eucalyptus Globulus*, referem que se pode fazer a aplicação diluindo 5 gotas de OE em 1 gota de óleo vegetal [14]. Se considerarmos que uma gota tem em média 50 µL (estimativa grosseira habitualmente utilizada na literatura e que depende, obviamente da densidade do óleo), este óleo é aplicado com uma concentração de 83,3% v/v. Assim, a aplicação deste óleo passa por concentrações muito elevadas quando comparadas às concentrações biocompatíveis do presente estudo (0,04% v/v).

Quando veiculado em formulações disponíveis no mercado, o OE de *E. globulus* apresenta-se também numa concentração mais elevada do que a gama de concentrações biocompatíveis obtidas neste trabalho. Considerando que a preparação Vicks Vaporub®, associação, pomada tem uma concentração de 15 mg/g de OE de eucalipto, ao compararmos este valor com a concentração biocompatível apresentada no presente estudo (0,04% v/v que corresponde a 0,4 mg/g se considerarmos a densidade do óleo 1 g/L), verificamos que a concentração de OE de *E. globulus* presente nesta pomada é muito superior (Tabela 2) [17].

O método utilizado em monocamada de células, é muito vantajoso pois permite obter resultados com simplicidade, reprodutibilidade e é bastante económico em comparação com modelos mais complexos [39]. No entanto, apresenta resultados apenas indicativos de como se comportaria este OE em contacto com um tecido. A natureza complexa da toxicidade induzida por compostos, não consegue ser capturada com precisão num único tipo de células, pois estes sistemas não refletem a fisiologia complexa de um órgão alvo [40]. Sendo por isso importante realizar mais estudos em modelos mais robustos, como modelos de células 3D que melhor replicam a pele, e assim ter uma maior aproximação com o que acontece *in vivo*, a fim de se determinar a toxicidade deste extrato. Efetivamente o facto de o óleo ser utilizado na pele sem qualquer diluição ou com diluição mínima e não serem reportados efeitos adversos graves sustenta, também, a exagerada sensibilidade deste modelo celular ao efeito do OE.

Em indivíduos saudáveis, os macrófagos em contacto com a endotoxina LPS promovem uma resposta inflamatória que se traduz na produção de NO por enzimas da família do óxido nítrico sintetases (NOS). Assim, a produção de NO pelos macrófagos tem um papel importante na resposta inflamatória e, conseqüentemente, na patogénese de doenças inflamatórias [41]. Quando o NO é produzido em grandes quantidades, este tem propriedades citotóxicas, que podem estar envolvidas na patogénese de doenças inflamatórias agudas e crónicas, sendo por isso interessante estudar a aplicação deste OE nestas patologias [42].

De acordo com os resultados obtidos, podemos verificar na Figura 12 que o extrato apresenta um moderado potencial anti-inflamatório. Tal como já se encontra descrito na literatura, verificou-se neste trabalho a existência de uma diminuição significativa na produção de nitritos pelos macrófagos quando estimulados com LPS na presença do extrato [42].

Para se tentar perceber o mecanismo da diminuição da produção de nitritos, realizou-se um ensaio para determinar a atividade *scavenging*. Assim, nas concentrações testadas, conseguimos verificar que apenas nas concentrações mais elevadas (1,25 e 2,50% v/v), existe uma maior captação de NO do meio, exercida pelo OE (Figura 13). Certos estudos indicam que este pode não ser o único mecanismo do potencial anti-inflamatório do extrato, como também poderá ter haver com a inibição da expressão do mRNA da iNOS (Óxido Nítrico Sintetase), uma das enzimas responsáveis pela produção de NO [42]. Nas concentrações testadas no ensaio de produção de NO (0,01, 0,02, 0,04 e 0,08% v/v), ao

compararmos os resultados com o ensaio da atividade *scavenging* conseguimos verificar que a diminuição não se dá apenas devido à atividade *scavenging* do extrato, pois não existe uma captação considerável do NO do meio nessas concentrações (Figura 12 e Figura 13).

Num estudo realizado por Ho et al (2020), com o objetivo de determinar atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais extraídos das folhas de quatro espécies diferentes do género *Eucalyptus* (*E. urophylla*, *E. grandis*, *E. camaldulensis* e *E. citriodora*), determinou-se que, em certas espécies deste género, estes óleos essenciais têm a capacidade de diminuir a produção de nitritos, mas que são citotóxicos. Desta forma, decidiram separar um dos extratos com o maior potencial anti-inflamatório, em frações utilizando uma coluna de sílica-gel, conseguindo encontrar e isolar a fração com maior atividade anti-inflamatória e que não apresentava citotoxicidade [43]. Assim, é importante prosseguir com futuras investigações, de forma a potenciar os efeitos anti-inflamatórios do extrato e diminuir a sua toxicidade.

## 6. Conclusão e perspectivas futuras

A utilização do OE de *E. globulus* é de elevado interesse, podendo ser uma alternativa como ativo ou adjuvante aos antifúngicos ou antibacterianos, pois verificou-se que possui atividade contra os fungos e bactérias patogénicas. No entanto, são necessários estudos para melhor compreender o seu mecanismo de ação.

Pelos resultados obtidos, verificamos que este OE apresenta citotoxicidade em monocamada celular a concentrações inferiores à sua atividade antimicrobiana. É preciso ter em conta, que apesar de ter uma elevada citotoxicidade, os óleos essenciais são compostos extremamente complexos e potentes, relativamente a outros extratos, e que as células são sensíveis à sua manipulação. Atualmente, existem estudos que, através da combinação de óleos essenciais com óleos de veiculação, demonstram a existência de sinergismo, ao manter ou potenciar a atividade antimicrobiana e diminuir a toxicidade dos extratos. Além disso, é necessário realizar mais estudos a fim de perceber a toxicidade deste óleo noutras linhas celulares, como células das vias respiratórias e outras células da pele, para possíveis aplicações em problemas respiratórios e doenças dermatológicas, e também com outros métodos que melhor repliquem a estrutura tridimensional da pele.

Conseguiu-se também perceber que o OE de *E. globulus* apresenta um moderado potencial anti-inflamatório nas concentrações biocompatíveis, sendo interessante a sua possível aplicação em certas patologias com uma componente inflamatória.

É necessário ter em consideração os fatores que podem contribuir para a variabilidade dos óleos essenciais, nomeadamente na sua composição. Estudos revelam que existem vários fatores endógenos e exógenos que levam a variabilidade dos constituintes dos óleos e por consequência diferenças na bioatividade.

Posto isto, e em adição aos resultados já obtidos para este OE, é indispensável realizar mais estudos a fim de perceber as diversas potencialidades deste OE como a atividade antiviral e o seu perfil de segurança. Mais ainda é importante a realização de estudos que avaliem os seus potenciais efeitos mutagénicos e genotóxicos, a sua fototoxicidade, testes de corrosão dérmica, irritação dérmica e sensibilização cutânea, para avaliar a possível integração deste OE em preparações terapêuticas.

## 7. Bibliografia

- [1] Figueiredo A Cristina, G. L. Pedro, G. J. Barroso, T. Helena, S. Joao, and M. Correia, “Óleos Essenciais De Espécie De Eucalyptus,” *Tecnol. Agroaliment.*, vol. 1, pp. 96–100, 2013.
- [2] Insitudo da Conservação da Natureza e das Florestas, “IFN6 - 6º Inventário Florestal Nacional,” 2015.
- [3] Florestas, “As espécies florestais mais comuns da floresta portuguesa,” 2020. <https://florestas.pt/conhecer/as-especies-florestais-mais-comuns-da-floresta-portuguesa/> (acedido a 20 de setembro de 2021).
- [4] A. Monteiro Alves, J. Santos Pereira, and J. M. Neves Silva, *O Eucaliptal em Portugal: Impactos Ambientais e Investigação Científica*. 2007.
- [5] E. V. Usachev, O. V. Pyankov, O. V. Usacheva, and I. E. Agranovski, “Antiviral activity of tea tree and eucalyptus oil aerosol and vapour,” *J. Aerosol Sci.*, vol. 59, pp. 22–30, 2013, doi: 10.1016/j.jaerosci.2013.01.004.
- [6] Integrated Taxonomic Information System, “Report: Eucalyptus globulus.” [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=27189#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=27189#null) (acedido a 20 de setembro de 2021).
- [7] F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, and M. Idaomar, “Biological effects of essential oils - A review,” *Food Chem. Toxicol.*, vol. 46, no. 2, pp. 446–475, 2008, doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
- [8] N. Z. Immaroh, D. E. Kuliahsari, and S. D. Nugraheni, “Review: Eucalyptus globulus essential oil extraction method,” *Int. Conf. Green Agro-industry Bioeconomy*, vol. 733, p. 12103, doi: 10.1088/1755-1315/733/1/012103.
- [9] R. Khandge and S. Professor, *Extraction of Essential Oil: Eucalyptus Oil*. 2018.
- [10] A. J. D. Silvestre, J. A. S. Cavaleiro, B. Delmond, C. Filliatre, and G. Bourgeois, “Analysis of the variation of the essential oil composition of Eucalyptus globulus Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis,” *Ind. Crops Prod.*, vol. 6, no. 1, pp. 27–33, Feb. 1997, doi: 10.1016/S0926-6690(96)00200-2.
- [11] Z. M. Cai *et al.*, “1,8-Cineole: a review of source, biological activities, and application,” *J. Asian Nat. Prod. Res.*, 2020, doi: 10.1080/10286020.2020.1839432.
- [12] A. Herman, A. P. Herman, B. W. Domagalska, and A. Młynarczyk, “Essential Oils and Herbal Extracts as Antimicrobial Agents in Cosmetic Emulsion,” *Indian J.*

- Microbiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 232–237, Nov. 2013, doi: 10.1007/s12088-012-0329-0.
- [13] M.-L. TSAI, C.-C. LIN, W.-C. LIN, and C.-H. YANG, “Antimicrobial, Antioxidant, and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils from Five Selected Herbs,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 75, no. 10, pp. 1977–1983, Oct. 2011, doi: 10.1271/bbb.110377.
- [14] Blossom Essence, “Óleo Essencial de Eucalipto.” [https://www.blossomessence.pt/?cix=detalhe\\_produto&cod=1008&marca=1&curr=963&lang=1&id\\_geral=963](https://www.blossomessence.pt/?cix=detalhe_produto&cod=1008&marca=1&curr=963&lang=1&id_geral=963) (acedido a 20 de setembro de 2021).
- [15] Biover, “Eucalipto globulus.” <https://www.biover.pt/pt-PT/biover/product-detail/eucalipto-globulus/175/> (acedido a 20 de setembro de 2021).
- [16] Farmácias Portuguesas, “Rhinomer Intense Eucalyptus Spray Nasal.” <https://ww1.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/index.php/catalog/product/view/id/444535/s/rhinomer-intense/category/979/> (acedido a 04 de outubro de 2021).
- [17] INFARMED I.P., “RCM - Vicks Vaporub, associação, pomada,” no. 5 ml, pp. 3–7, 2019.
- [18] EMA. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), “Assessment report on *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker and/or *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, aetheroleum,” 2013, Acedido: 21 de setembro de 2021 [Online]. Disponível: [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu).
- [19] EMA. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC), “Community herbal monograph on *Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus polybractea* R.T. Baker and/or *Eucalyptus smithii* R.T. Baker, aetheroleum,” vol. 44, no. April, pp. 2–11, 2013, [Online]. Disponível: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-eucalyptus-globulus-labill-eucalyptus-polybractea-rt-baker/eucalyptus-smithii-rt-baker-aetheroleum\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-eucalyptus-globulus-labill-eucalyptus-polybractea-rt-baker/eucalyptus-smithii-rt-baker-aetheroleum_en.pdf)[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herba](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herba).
- [20] EMA, “Well-established use.” <https://www.ema.europa.eu/en/glossary/well-established-use> (acedido a 20 de setembro de 2021).
- [21] Ministério da Saúde (Brasil), *Informações Sistematizadas da Relação Nacional de PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AO SUS - EUCALYPTUS GLOBULUS LABILL. – EUCALIPTO*. 2018.

- [22] NCCLS, M7-A6 - *Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico : Norma Aprovada - Sexta Edição*, vol. 23, no. 2. 2003.
- [23] NCCLS, M27-A2 - *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica : Norma Aprovada – Segunda Edição*, vol. 22, no. 15. 2012.
- [24] CLSI, M38-A - *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada*, vol. 22, no. 16. 2002.
- [25] “ISO 11930:2019 - Cosmetics — Microbiology — Evaluation of the antimicrobial protection of a cosmetic product.” <https://www.iso.org/standard/75058.html> (acedido a 04 de outubro de 2021).
- [26] “ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.” <https://www.iso.org/standard/36406.html> (acedido a 04 de outubro de 2021).
- [27] R. Bruggisser, K. Daeniken, G. Jundt, W. Schaffner, and H. Tullberg-Reinert, “Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay,” *Planta Med.*, vol. 68, no. 5, pp. 445–448, 2002, doi: 10.1055/S-2002-32073.
- [28] G. P. Moran, D. C. Coleman, and D. J. Sullivan, “Candida albicans versus Candida dubliniensis: Why Is C. albicans more pathogenic?,” *Int. J. Microbiol.*, 2012, doi: 10.1155/2012/205921.
- [29] V. Agarwal, P. Lal, and V. Pruthi, “Effect of Plant Oils on Candida albicans,” *J. Microbiol. Immunol. Infect.*, vol. 43, no. 5, pp. 447–451, Oct. 2010, doi: 10.1016/S1684-1182(10)60069-2.
- [30] G. R. Vilela *et al.*, “Activity of essential oil and its major compound, 1,8-cineole, from *Eucalyptus globulus* Labill., against the storage fungi *Aspergillus flavus* Link and *Aspergillus parasiticus* Speare,” *J. Stored Prod. Res.*, vol. 45, no. 2, pp. 108–111, Apr. 2009, doi: 10.1016/J.JSPR.2008.10.006.
- [31] E. R. Hendry, T. Worthington, B. R. Conway, and P. A. Lambert, “Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 64, no. 6, pp. 1219–1225, Dec. 2009, doi: 10.1093/JAC/DKP362.

- [32] M. Letek, E. Ordóñez, I. Fernández-Natal, J. A. Gil, and L. M. Mateos, "Identification of the emerging skin pathogen *Corynebacterium amycolatum* using PCR-amplification of the essential divIVA gene as a target," *FEMS Microbiol. Lett.*, vol. 265, no. 2, pp. 256–263, Dec. 2006, doi: 10.1111/J.1574-6968.2006.00492.X.
- [33] R. G. Bachir and M. Benali, "Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*," *Asian Pac. J. Trop. Biomed.*, vol. 2, no. 9, p. 739, 2012, doi: 10.1016/S2221-1691(12)60220-2.
- [34] M. V. S, T. RN, and P. V. B, "[Antimicrobial activity of *Eucalyptus globulus* oil, xylitol and papain: a pilot study]," *Rev. Esc. Enferm. USP.*, vol. 49, no. 2, pp. 216–220, 2015, doi: 10.1590/S0080-623420150000200005.
- [35] A. Barra, "Factors Affecting Chemical Variability of Essential Oils: a Review of Recent Developments."
- [36] M. Hyldgaard, T. Mygind, and R. L. Meyer, "Essential Oils in Food Preservation: Mode of Action, Synergies, and Interactions with Food Matrix Components," *Front. Microbiol.*, vol. 0, no. JAN, p. 12, 2012, doi: 10.3389/FMICB.2012.00012.
- [37] H. Khazraei, S. Shamsdin, and M. Zamani, "In Vitro Cytotoxicity and Apoptotic Assay of *Eucalyptus globulus* Essential Oil in Colon and Liver Cancer Cell Lines," *J. Gastrointest. Cancer*, Mar. 2021, doi: 10.1007/S12029-021-00601-5.
- [38] A. Orchard, G. Kamatou, A. M. Viljoen, N. Patel, P. Mawela, and S. F. V. Vuuren, "The influence of carrier oils on the antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2019, 2019, doi: 10.1155/2019/6981305.
- [39] J. M. Edmondson, L. S. Armstrong, and A. O. Martinez, "A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures," *J. tissue Cult. methods 1988 111*, vol. 11, no. 1, pp. 15–17, Mar. 1988, doi: 10.1007/BF01404408.
- [40] A. Roth and T. Singer, "The application of 3D cell models to support drug safety assessment: Opportunities & challenges," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 69–70, pp. 179–189, Apr. 2014, doi: 10.1016/J.ADDR.2013.12.005.
- [41] F. Zhao, H. Nozawa, A. Daikonnya, K. Kondo, and S. Kitanaka, "Inhibitors of nitric oxide production from hops (*Humulus lupulus* L.)," *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 26, no. 1, pp. 61–65, Jan. 2003, doi: 10.1248/BPB.26.61.

- [42] E. Vigo, A. Cepeda, O. Gualillo, and R. Perez-Fernandez, “In-vitro anti-inflammatory effect of *Eucalyptus globulus* and *Thymus vulgaris*: nitric oxide inhibition in J774A.1 murine macrophages,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 56, no. 2, pp. 257–263, Feb. 2004, doi: 10.1211/0022357022665.
- [43] C.-L. Ho, L.-H. Li, Y.-C. Weng, K.-F. Hua, and T.-C. Ju, “*Eucalyptus* essential oils inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through reducing MAPK and NF- $\kappa$ B pathways,” doi: 10.1186/s12906-020-02999-0.

# Capítulo II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

## 1. Introdução

A farmácia comunitária, devido à sua acessibilidade à população, é uma das primeiras portas para o Sistema de Saúde. Caracteriza-se como um espaço de prestação de cuidados de saúde com elevada diferenciação técnico-científica oferecendo um serviço de proximidade e elevado nível de confiança entre o farmacêutico e os utentes.

O farmacêutico comunitário exerce diversas funções que estão diretamente relacionadas com a saúde e o bem-estar da população. Como profissionais de saúde especialistas do medicamento, os farmacêuticos são dotados de competências capazes de gerir e otimizar as terapêuticas instituídas, promover o uso seguro e racional dos medicamentos, evitando problemas associados à sua utilização e contribuindo para o sucesso dos objetivos terapêuticos. Para além da cedência e da revisão da medicação, o farmacêutico é capaz de realizar vários procedimentos clínicos como a medição de parâmetros bioquímicos, administração de vacinas e medicamentos, bem como o controlo e prevenção de diversas patologias. Tem também um papel importante na educação para a saúde e na farmacovigilância.

O presente relatório descreve os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos no meu primeiro contacto direto com a profissão. O estágio curricular decorreu de 8 de fevereiro de 2021 a 18 de junho de 2021 na Farmácia São Cosme (FSC), situada na Covilhã, sob orientação do Dr. Carlos Tavares e restante equipa.

## 2. Organização e caracterização da Farmácia

### 2.1. Localização, caracterização dos utentes e horário de funcionamento

A FSC localiza-se na Alameda Europa, Lote 15, Fração D e E, no concelho da Covilhã em que os proprietários são o Dr. Carlos Alberto Gama Tavares, o diretor técnico, e a Dr.<sup>a</sup> Alexandrina Tavares.

A farmácia encontra-se situada numa das principais avenidas da cidade, numa zona habitacional e perto de um centro comercial sendo por isso frequentada por todas as faixas etárias. A população que frequenta a FSC é bastante abrangente desde estudantes universitários, pessoas de idade média e idosos. Estes últimos são utentes que já frequentem a farmácia há alguns anos, notando-se um nível de proximidade e confiança maior. Para além disso, também permite a existência de ficha na farmácia, onde se pode consultar o histórico medicamentoso destes utentes, permitindo assim um acompanhamento e seguimento farmacoterapêutico mais cuidado, o que é bastante importante uma vez que muitos se encontram polimedicados. A existência de ficha na farmácia apenas é possível se o utente assinar uma declaração de consentimento informado, autorizando que a farmácia fique com os seus dados, tal como prevê o Regulamento Geral de Proteção de Dados (RGPD).

O horário de funcionamento da FSC é das 9h às 12h30 e das 14h às 19h00 de Segunda a Sexta-Feira e das 9h às 13h aos Sábados, cumprindo o limite mínimo das 44 horas de funcionamento semanal, tal como disposto no ponto 1 do artigo 2º da Portaria n.º 277/2012, de setembro de 2012 [1]. A farmácia efetua, uma vez por semana, o turno de serviço permanente, de acordo com as escalas de turno aprovadas pela Administração Regional de Saúde (ARS).

## **2.2. Espaço físico da Farmácia**

### **2.2.1. Espaço exterior**

No exterior pode identificar-se facilmente a farmácia por uma cruz verde luminosa que contém informações rotativas acerca da temperatura, data, horário de funcionamento ou com a indicação que é a farmácia de serviço e por três letreiros na fachada frontal, perpendicular e retaguarda do edifício com o respetivo nome.

Na porta pode-se observar uma placa com o nome do diretor técnico, papéis informativos com o horário de funcionamento, lista de serviços prestados pela farmácia, a indicação de adesão ao cartão “Saúda” das “Farmácias Portuguesas” e o mapa com as escalas de turnos mensais das farmácias do município aprovadas pela ARS, o que vai ao encontro do ponto 1 do artigo 28.º do Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto alterado pelo Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto [2], [3].

Para além disso, a FSC é constituída por várias montras de vidro utilizadas para promover vários produtos sazonais, campanhas promocionais e conferir luminosidade ao interior da farmácia.

Tal como é mencionado nas normas gerais de Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária (BPF), a FSC garante acessibilidade a todos os seus potenciais utentes, como crianças, idosos e cidadãos portadores de deficiências [4]. A entrada principal da farmácia é constituída por duas portas, uma exterior e outra mais interna, o que permite aos utentes serem resguardados do exterior enquanto esperam pela sua vez de serem atendidos.

### **2.2.2. Espaço interior e equipamento**

De acordo com o artigo 29.º do Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de agosto alterado pelo Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto “*as farmácias devem dispor de instalações adequadas a garantir: a segurança, conservação e preparação dos medicamentos e a acessibilidade, comodidade e privacidade dos utentes e do respetivo pessoal*” [2].

O interior da FSC é moderno, bem iluminado com luz natural e ventilação adequada. A FSC encontra-se organizada de forma a otimizar o espaço, cumprindo os requisitos de instalação que estão descritos no artigo 2.º da Deliberação nº 1502/2014, de 3 de julho em que as farmácias devem dispor obrigatoriamente e separadamente das seguintes divisões: sala de atendimento ao público, armazém, laboratório, instalações sanitárias e gabinete de atendimento personalizado, com áreas mínimas que estão legalmente impostas. A farmácia pode ainda apresentar divisões facultativas como o gabinete de direção técnica, a zona de recolhimento ou quarto, a área técnica de informática e economato [5].

A FSC tem dois pisos. No rés-do-chão localiza-se a sala de atendimento ao público, onde se encontram quatro balcões devidamente equipados e espaçados, de forma a permitir privacidade aos utentes durante o atendimento. Este espaço apresenta diversos sofás, que podem ser utilizados pelos utentes enquanto aguardam a sua vez. Esta zona apresenta oito armários de exposição para produtos de saúde e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). Estes encontram-se divididos nas seguintes categorias: fitoterapia, buco-dentários, cuidados familiares, dermocosmética, podologia, cuidados maternos, higiene infantil, puericultura, alimentação infantil, capilares e homem, existindo um linear específico para protetores solares e expositores para produtos ortopédicos, canadianas e perfumes. Atrás dos balcões de atendimento,

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

encontram-se gavetas com produtos de elevada rotatividade como analgésicos, antipiréticos, pílulas, material de primeiros socorros, entre outros. Nesta divisão encontra-se um equipamento que permite aos utentes realizarem diversas medições como o peso, altura, índice de massa corporal (IMC), pressão arterial (PA) e percentagem de massa gorda.

Esta sala dá acesso às instalações sanitárias destinadas aos utentes, a um gabinete de atendimento personalizado e a um quarto que serve de apoio a quem realiza os serviços de atendimento permanente.

O gabinete de atendimento personalizado permite um atendimento com uma maior privacidade, por exemplo quando é necessário o farmacêutico avaliar uma situação mais intimista exposta pelo utente. Neste gabinete também se realizam a administração de injetáveis e vacinas passíveis de administração em farmácia e medições de parâmetros bioquímicos como testes de glicémia e colesterol total, sendo equipado por um computador, uma mesa e cadeiras, reservatório para recolha de resíduos biológicos e corto-perfurantes, um kit de emergência e o equipamento adequado à realização destas medições.

No mesmo piso, a farmácia dispõe de uma área dedicada à receção de encomendas, onde se encontra uma bancada com um computador, um dispositivo de leitura ótica e duas impressoras, em que uma delas se destina exclusivamente à impressão de etiquetas. Nesta divisão situa-se um módulo de gavetas deslizantes onde se armazenam a maior parte dos medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), organizados de acordo com a sua forma farmacêutica ou finalidade (comprimidos/cápsulas, carteiras, medicamentos de uso veterinário, injetáveis, transdérmicos, pomadas, pomadas oftálmicas, colírios, gotas, supositórios, ginecológicos e dispositivos de inalação). Existe também um armário com prateleiras basculantes onde se encontram os xaropes, pós, loções, ampolas, pomadas grandes, produtos do protocolo da diabetes, produtos para ostomias, máscaras, luvas, entre outros. Para os produtos que têm de ser armazenados no frio, existe um frigorífico.

Esta área dá acesso ao gabinete do diretor técnico, ao laboratório, às instalações sanitárias destinadas aos profissionais e a uma zona de cacifos.

De acordo com a Deliberação n.º 1500/2004, de 7 de dezembro o laboratório da FSC contém todo o equipamento mínimo obrigatório, e ainda é constituído por um lavatório

e armários onde consta a documentação relativa a medicamentos manipulados e onde se armazenam as diversas matérias-primas [6]. Esta área destina-se principalmente para a preparação de manipulados, estando assim asseguradas todas as especificações de iluminação e ventilação [6].

No piso superior, encontra-se a área de informática e o armazém, destinado aos excedentes dos medicamentos e produtos de saúde organizados por ordem alfabética.

### **2.3. Recursos informáticos**

Na FSC o sistema informático utilizado é o *Sifarma2000*, patenteado pela *Glintt*<sup>®</sup> - *Global Intelligence Technologies*. Este sistema está dividido em seis módulos principais: atendimento, gestão de encomendas, receção de encomendas, gestão de lotes por faturar, gestão de utentes, e gestão de produtos. Neste sentido, através dele é possível realizar várias funções como o atendimento, gestão e receção de encomendas, devoluções e respetiva regularização, quebras, controlo dos prazos de validade, monitorização dos stocks, gestão de produtos, faturação, etiquetagem de produtos de venda livre, entre outras funcionalidades. Este sistema encontra-se instalado em todos os computadores nos balcões de atendimento e no computador da zona de receção de encomendas.

Durante o atendimento, o sistema informático consegue nos fornecer informação relativamente ao medicamento, como a classificação ATC, indicações terapêuticas, composição quantitativa e qualitativa, posologia, precauções, interações, contraindicações, reações adversas e o grupo homogéneo. Estas informações são uma mais-valia pois permitem fazer um aconselhamento bastante individualizado ao utente, completo e com informação fidedigna relativa aos medicamentos dispensados. Para além disso, o sistema consegue alertar o farmacêutico para interações entre os diversos medicamentos aquando da dispensa, sendo possível minimizar erros de prescrição.

Este sistema, permite a criação de ficha dos utentes, se por eles autorizado, onde passará a constar todo o histórico medicamentoso. Esta funcionalidade permite ao farmacêutico avaliar a terapia farmacológica de cada utente e também reduzir erros relacionados à prescrição e possíveis interações.

Todos os profissionais da FSC possuem uma credencial de *login* exclusivas a cada um. Deste modo cada operador trabalha com a sua credencial aquando trabalhando no programa. Assim, todas as tarefas realizadas são facilmente identificadas, facilitando o esclarecimento de dúvidas que possam surgir após execução das mesmas.

O *Sifarma2000*, permite a realização de um trabalho rápido, seguro e eficiente sendo importante o farmacêutico familiarizar-se com o programa. No entanto, em algumas situações, podem surgir dificuldades técnicas, podendo levar a alguns constrangimentos no desempenho das funções. Nestas situações, A *Glintt*<sup>®</sup> deve ser contactada de forma a solucionar o problema e a prestar o apoio técnico remoto necessário.

## 2.4. Recursos humanos

Como disposto nos artigos 23.º e 24.º do Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto, alterados, respetivamente, pelo Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto e pela Lei n.º 16/2013, de 8 de fevereiro, as farmácias podem ter no seu quadro técnico pessoal farmacêutico, que devem constituir a maioria dos trabalhadores da farmácia, e não farmacêutico, onde se incluem os técnicos de farmácia e pessoal devidamente habilitado. As farmácias devem dispor, no mínimo, de um diretor técnico e de outro farmacêutico [2], [3], [7]. Na FSC, o quadro de pessoal é constituído exclusivamente por farmacêuticos. A equipa é constituída por 4 elementos:

- Dr. Carlos Tavares - Diretor técnico
- Dr.<sup>a</sup> Ana Dulce Raposo- Farmacêutica Substituta (exerce as funções do Diretor técnico na sua ausência)
- Dr.<sup>a</sup> Ana Rita Santos – Farmacêutica
- Dr.<sup>a</sup> Alexandrina Tavares - Farmacêutica

É o Dr. Carlos Tavares, diretor técnico, que assume a responsabilidade pelos atos farmacêuticos praticados na farmácia; garante a prestação de esclarecimentos aos utentes sobre o modo de utilização dos medicamentos; promove o uso racional do medicamento; assegura que os medicamentos sujeitos a receita médica só são dispensados aos utentes que a não apresentem em casos de força maior, devidamente justificados; garante que os medicamentos e demais produtos são fornecidos em bom estado de conservação; garante que a farmácia se encontra em condições de adequada higiene e segurança; assegura que a farmácia dispõe de um aprovisionamento suficiente de medicamentos; zela para que o pessoal que trabalha na farmácia mantenha, em permanência, o asseio e a higiene; verifica o cumprimento das regras deontológicas da atividade farmacêutica e assegura o cumprimento dos princípios e deveres previstos na legislação reguladora da atividade farmacêutica tal como previsto no artigo 21.º do Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto, alterado pelo Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto [2], [3]. Para além de desempenhar as funções já referidas, o diretor técnico assume também o controlo dos sistemas de gestão e qualidade da farmácia. É também

responsável pela realização, envio de propostas e receção das encomendas. No entanto, caso não esteja presente, os restantes elementos da equipa executam essas tarefas.

A Dr.<sup>a</sup> Ana Rita Santos é responsável pela gestão das redes sociais, como criação e publicação da imagem referente a campanhas promocionais e divulgação de novos produtos. A Dr.<sup>a</sup> Ana Dulce Raposo realiza periodicamente a verificação e a correção dos prazos de validade, efetua devoluções e as suas respetivas regularizações e a monitorização semanal dos termohigrómetros. Para além disso, a Dr.<sup>a</sup> Ana Rita Santos e a Dr.<sup>a</sup> Ana Dulce Raposo são ainda as principais responsáveis pela arrumação dos medicamentos, reposição de stocks preparação de manipulados, medição de parâmetros bioquímicos e, rotativamente, pela execução da faturação e controlo de receituário. A Dr.<sup>a</sup> Alexandrina Tavares é a responsável pelo controlo e registo da entrada e saída dos psicotrópicos, estupefacientes e benzodiazepinas e a principal gestora dos produtos cosméticos e da elaboração das montras e campanhas promocionais.

A validação das prescrições médicas, a dispensa de medicamentos e o aconselhamento farmacoterapêutico é responsabilidade de toda a equipa, aquando do atendimento ao público.

## **2.5. Informação e documentação científica**

Durante a prática farmacêutica podem surgir dúvidas, necessidade de confirmar ou até mesmo de adquirir conhecimento. O farmacêutico deve prestar um aconselhamento devidamente fundamentado e qualquer auxílio ao utente no âmbito da terapia instituída e em outros serviços farmacêuticos prestados, assim é importante consultar e basear a ação do farmacêutico em literatura técnico-científica credível e atualizada. É por isso uma mais-valia ter acesso a fontes de carácter científico para consulta imediata na farmácia, para que o farmacêutico se mantenha devidamente informado e atualizado e consiga esclarecer o utente com informação fidedigna.

De acordo com o artigo 37.º do Decreto-Lei nº 307/2007, de 31 de agosto, “*as farmácias dispõem nas suas instalações da Farmacopeia Portuguesa, em edição papel, em formato eletrónico ou online, a partir de sítio da internet reconhecido pelo INFARMED*” [2]. De acordo com as BPF, são consideradas fontes de acesso obrigatório no momento da dispensa de medicamentos o Prontuário Terapêutico e os Resumos das Características dos Medicamentos [4].

Desta forma, a FSC possui a Farmacopeia Portuguesa (FP), o Formulário Galénico Português (FGP), consultados sempre que necessário para a preparação de medicamentos manipulados e o Pontuário Terapêutico (PT) e o Resumo das Características do Medicamento (RCM) para consulta quando surgem dúvidas relativas aos medicamentos dispensados.

A FSC também dispõe de centros de documentação e informação sempre que for necessário esclarecer dúvidas relativamente às diversas terapêuticas como o Centro de Documentação e Informação de Medicamentos (CEDIME) da Associação Nacional de Farmácias (ANF), o Centro de Informação do Medicamento (CIM) da Ordem dos Farmacêuticos (OF) e o Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada (CIMPI) disponibilizado pelo Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF) direcionado para os medicamentos manipulados.

Durante o período de estágio tive a oportunidade de consultar algumas destas fontes, nomeadamente o RCM de alguns medicamentos disponíveis no INFOMED, de forma a aprofundar algumas questões que foram surgindo. Para além disso, também contactei com o LEF para solicitar uma técnica de preparação de creme de permectrina a 5% e esclarecer dúvidas relativamente a essa mesma preparação.

### **3. Medicamentos e outros produtos de saúde**

De acordo com a legislação em vigor, as farmácias estão autorizadas a vender medicamentos, substâncias medicamentosas, medicamentos e produtos veterinários, medicamentos e produtos homeopáticos, produtos naturais, dispositivos médicos, suplementos alimentares e produtos de alimentação especial, produtos fitofarmacêuticos, produtos cosméticos e de higiene corporal, artigos de puericultura e produtos de conforto [2], [3].

Durante o meu período de estágio na FSC contactei diretamente com, e adquiri conhecimento científico acerca de todos os produtos. Tive a oportunidade de esclarecer dúvidas com toda a equipa, contactar diretamente com delegados de vendas sobre novos produtos no mercado e participar em formações sobre diversos produtos.

### 3.1. Definição de conceitos

O dever do farmacêutico é dispensar e aconselhar todos os produtos de saúde e medicamentos, pelo que é de extrema importância dominar e saber a diferença entre todos os conceitos a eles associados.

O Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, define o medicamento como “*toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas*” [8].

Durante o atendimento, o utente tem a oportunidade de optar por um medicamento de referência (marca) ou por um genérico, pois a maior parte das prescrições apresenta apenas o princípio ativo. Deste modo, é necessário ter em conta as seguintes definições:

- Medicamento de referência: “*medicamento que foi autorizado com base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos*” [8];
- Medicamento genérico: “*medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados*” [8].

Para além disso, certas prescrições apresentam medicamentos que têm de ser preparados na farmácia, os medicamentos manipulados, que são “*qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico*” [8]. É importante nestas situações distinguir os seguintes conceitos:

- Fórmula magistral: “*medicamento preparado em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares segundo receita médica que especifica o doente a quem o medicamento se destina*” [8];
- Preparado oficial: “*qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais, de uma farmacopeia ou de um formulário, em farmácia de oficina ou nos serviços farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço*” [8].

Com menor frequência, são solicitados medicamentos homeopáticos que consistem em medicamentos obtidos “*a partir de substâncias denominadas stocks ou matérias-*

*primas homeopáticas, de acordo com um processo de fabrico descrito na farmacopeia europeia ou, na sua falta, em farmacopeia utilizada de modo oficial num Estado membro, e que pode conter vários princípios” [8].*

Existem certos medicamentos cuja cedência e aconselhamento devem ter uma maior atenção por parte do profissional. É o caso dos medicamentos que incluem na sua composição psicotrópicos e estupefacientes, que são substâncias que “*atuam diretamente sobre o sistema nervoso central, logo com impacto em todo o organismo humano, podendo atuar como depressores ou estimulantes*”. Estes medicamentos necessitam de um acompanhamento redobrado pois podem causar habituação, dependência física e psíquica e estar associados a atos ilícitos como o tráfico e consumo de drogas, estando por isso sujeitos a uma legislação especial [9]. Desta forma, o farmacêutico deve saber identificar e dispensar estes medicamentos apenas segundo as regras impostas, prevenindo a sua utilização inadequada.

No capítulo 7 do presente relatório serão abordados e discutidos os restantes produtos de saúde disponíveis para venda ao público na farmácia.

### **3.2. Sistemas de classificação de medicamentos**

Em farmácia comunitária existem três tipos de classificações de medicamentos amplamente utilizados:

- Classificação ATC (“*Anatomical Therapeutic Chemical*”);
- Classificação farmacoterapêutica;
- Classificação por forma farmacêutica.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou a ATC, que divide os fármacos em grupos e subgrupos de acordo com o órgão ou sistema em que atuam, considerando ainda as suas propriedades terapêuticas, farmacológicas e químicas. Esta classificação é alfanumérica e apresenta cinco níveis. O primeiro nível corresponde ao grupo anatómico onde o fármaco atua. O segundo nível representa o principal grupo terapêutico, o terceiro nível o subgrupo farmacológico, o quarto nível representa o subgrupo químico e o quinto nível corresponde ao nome da substância ativa. [10] A classificação ATC encontra-se disponível no *Sifarma 2000*. A Tabela 8 representa um esquema da aplicação da classificação ATC à azitromicina.

**Tabela 8** - Esquema da classificação ATC para a azitromicina [10].

<b>J</b>	Anti-infecciosos de uso sistémico
<b>Jo1</b>	Antibacterianos de uso sistémico
<b>Jo1F</b>	Macrólidos, lincosamidas e estreptograminas
<b>Jo1FA</b>	Macrólidos
<b>Jo1FA10</b>	Azitromicina

A classificação farmacoterapêutica vai de encontro à classificação ATC. Esta é dividida em vinte grupos distintos de acordo com o local em que a substância atua. Esta classificação é utilizada nos instrumentos de apoio à prescrição como o prontuário terapêutico e o formulário hospitalar nacional de medicamentos. O Despacho n.º 4742/2014, de 2 de abril, apresenta a classificação farmacoterapêutica e a sua equivalência com a classificação ATC [11].

A classificação por forma farmacêutica, tal como o nome indica, agrupa os fármacos com base no estado final que as substâncias ativas ou excipientes apresentam depois de submetidas às operações farmacêuticas necessárias, a fim de facilitar a sua administração e/ou obter o maior efeito terapêutico desejado [8].

## **4. Aproveitamento e Armazenamento**

Na farmácia comunitária, é crucial a correta gestão de stocks de forma a garantir o acesso dos medicamentos e produtos de saúde aos utentes e preservar a sua qualidade de vida. A nível económico é também um ponto fundamental, devendo os stocks ser potenciados e simultaneamente rentabilizados atendendo à situação financeira de cada farmácia garantindo a sua sustentabilidade. Deste modo, é imprescindível a elaboração correta de encomendas e a gestão de stocks e validades para garantir que todos os produtos se encontram seguros, em bom estado e em quantidades necessárias. Durante as primeiras semanas de estágio tive oportunidade de lidar diretamente com o aproveitamento e armazenamento das encomendas.

### **4.1. Critérios de seleção de um fornecedor/armazenista**

A seleção de um fornecedor é um dos pontos fundamentais na gestão da farmácia. Em Portugal, existem vários distribuidores grossistas em que cada farmácia pode adquirir

diversos medicamentos e produtos de saúde. Devem ser ponderados vários fatores aquando da seleção de um fornecedor adequado, tais como: preço de aquisição, bonificações, descontos, proximidade à farmácia, condições e rapidez de entrega, disponibilidade dos produtos, qualidade do serviço prestado e condições de devolução e respetivo reembolso.

Durante o atendimento, deparei-me diversas vezes com a necessidade de seleção do fornecedor mais adequado para encomendas específicas com determinados produtos solicitados pelos utentes, ponderando os fatores anteriormente enumerados.

## **4.2. Fornecedores**

O fornecedor principal da FSC é a *Plural+Udifar*. Neste fornecedor a farmácia efetua a maior parte das suas compras visto que é o que oferece as melhores condições. Adicionalmente, a *Alliance Healthcare* funciona como um fornecedor secundário para adquirir os produtos que tenham melhores condições ou quando alguns se encontram esgotados no fornecedor principal. Ambos os fornecedores efetuam duas entregas diárias. A FSC também recorre ocasionalmente à *OCP Portugal* para adquirir produtos que apresentem melhores descontos.

Por vezes a farmácia recorre à compra direta de produtos aos laboratórios e/ou por intermédio de delegados comerciais, como é o caso de produtos de dermocosmética e produtos que são encomendados em grandes quantidades.

## **4.3. Critérios de aquisição dos medicamentos e produtos de saúde**

No processo de aquisição dos medicamentos e produtos de saúde, devem ser tidos em conta vários fatores e definidos vários critérios de forma a garantir que o stock é o adequado para satisfazer as necessidades da população.

Alguns dos fatores que influenciam a aquisição de um produto por parte da farmácia são: os hábitos de prescrição praticados pelos médicos; as escolhas preferenciais dos utentes; a rotatividade mensal de certos produtos; o preço de venda ao público; o tipo de utentes na farmácia, tendo em conta a idade; as condições económicas e as necessidades individuais de cada utente. Adicionalmente a sazonalidade é um fator importante a considerar, pois em diferentes épocas do ano existem patologias com maior incidência,

como as rinites sazonais no Inverno e as rinites alérgicas na Primavera, onde há uma maior procura de certos medicamentos e produtos de saúde por estes doentes.

O programa *Sifarma 2000* permite à farmácia definir stocks mínimos e máximos com base nos critérios anteriormente enumerados. Esta funcionalidade é uma mais-valia pois permite evitar o excesso de produtos ou ruturas do stock. Neste sentido, o sistema consegue gerar uma proposta de encomenda com base nos produtos que estejam abaixo do stock mínimo e numa quantidade necessária para atingir o stock máximo definido.

#### **4.4. Elaboração e conferência de encomendas**

Na farmácia existem diversos tipos de encomendas:

- Encomendas diárias;
- Encomendas instantâneas;
- Via Verde do Medicamento;
- Encomendas por telefone ou via e-mail.

As encomendas diárias são realizadas duas vezes por dia, automaticamente no *Sifarma 2000*, de acordo com os stocks máximos e mínimos definidos pela farmácia. A proposta da encomenda diária é então analisada e alterada consoante as necessidades da farmácia e diversos fatores, como o histórico de saídas e os preços de cada fornecedor. Todos os produtos encontram-se definidos na listagem do fornecedor habitual, mas caso se verifiquem melhores condições noutra armazenista, efetua-se a transferência da encomenda. Por fim, a encomenda é aprovada e enviada para o respetivo fornecedor.

As encomendas instantâneas são efetuadas maioritariamente durante o atendimento ao público quando determinado produto é solicitado pelos utentes e não se encontra disponível no stock da farmácia naquele momento. Estas encomendas realizam-se no *Sifarma*, recorrendo à ficha do produto. Neste caso, deve-se selecionar o fornecedor que possua um preço adequado e um horário de entrega que melhor se ajuste à disponibilidade do utente.

A Via Verde do Medicamento, é uma via excecional de aquisição de medicamentos que se realiza através de uma receita médica válida. Apenas os medicamentos que se encontram na lista do projeto “Via Verde do Medicamento”, disponível no site do INFARMED, podem ser adquiridos através desta via [12].

As encomendas por telefone ou via e-mail também constituem uma prática frequente na FSC. Este tipo de encomendas normalmente é realizado diretamente ao laboratório, pelos delegados comerciais, quando se pretende adquirir uma quantidade elevada de determinados produtos, podendo-se obter melhores condições de pagamento, descontos e bonificações ou quando os medicamentos se encontram esgotados nos distribuidores. Neste tipo de encomendas, como o programa não gera nenhuma encomenda no separador “receção de encomendas”, é necessário criar uma encomenda manual no separador “gestão de encomendas” para que esta possa ser rececionada.

Durante o meu período de estágio tive a oportunidade de realizar e contactar com todos os tipos de encomendas.

## **4.5. Receção de encomendas**

Na FSC as encomendas são recebidas em dois momentos diferentes do dia, de manhã (as que foram realizadas no fim da tarde do dia anterior) e de tarde (as que foram feitas no fim da manhã do próprio dia). Todas as encomendas chegam em baques<sup>1</sup>, com a respetiva fatura ou guia de remessa, que pode ser ou não duplicada, onde deve constar o número da fatura, o código nacional do produto (CNP), a data, a identificação do fornecedor, a quantidade encomenda, a quantidade fornecida, o preço de venda ao público (PVP), preço de venda ao armazenista (PVA) e o preço de venda à farmácia (PVF). Por vezes, há produtos que são encomendados, mas que não são fornecidos, isto acontece quando os produtos se encontram esgotados ou indisponíveis e a fatura é acompanhada de uma lista onde vêm discriminados esses produtos, juntamente com a justificação da não entrega.

Após a chegada da encomenda, a pessoa responsável verifica a existência da fatura ou guia de remessa, necessária para se proceder à receção. Os produtos que necessitam de refrigeração vêm acondicionados em caixas térmicas para transporte de frio dentro dos contentores e são os primeiros a ser rececionados e armazenados no frigorífico de modo a manterem a sua estabilidade.

---

<sup>1</sup> Baques, contentores ou banheiras são caixas de plástico seladas e com coloração variada dependendo do armazenista que a entrega. Este recipiente é usado para transportar os medicamentos e produtos de saúde, do armazenista à farmácia.

Todo o procedimento de recepção das encomendas é realizado no *Sifarma*, onde se encontram registadas todas as encomendas por rececionar. No caso de haver várias encomendas para o mesmo fornecedor, que foram faturadas em conjunto, é necessário seleccioná-las e agrupá-las. Após seleccionar a encomenda que se pretende rececionar coloca-se número da fatura, o valor e o número de embalagens totais. De seguida, procede-se à leitura ótica de cada produto e verifica-se a integridade do mesmo e da embalagem, a validade, o PVF, o PVP e a quantidade fornecida [4]. Neste sentido, a validade apenas é alterada quando o produto em questão não se encontra em stock ou quando é inferior à do stock existente, principalmente se o prazo de validade for curto. O PVP é alterado caso não exista nenhum produto em stock. Se existir o PVP não sofre nenhuma alteração e os produtos com novo preço são devidamente assinalados para posterior alteração (e neste caso são dispensados em último).

Após terminar a leitura ótica de todos os produtos, confere-se se o número de embalagens introduzidas corresponde ao que foi encomendado e se o valor da fatura no sistema fica a verde. Deste modo, a recepção da encomenda dá-se como terminada. De seguida, arquivam-se todas as faturas no dossiê correspondente a cada fornecedor.

As matérias-primas são rececionadas usando o mesmo procedimento, no entanto, são acompanhadas por um boletim de análise. Este boletim deve ser identificado com o número da fatura, fornecedor e data de recepção. É necessário também verificar se o número de lote no boletim de análise corresponde ao da matéria-prima adquirida. Por fim, é arquivado num dossiê para esse efeito durante três anos mesmo após o término da sua validade.

No final do mês, é enviado por correio um documento, em duplicado, que contém a informação relativa a todas as requisições de medicamentos psicotrópicos, estupefacientes e benzodiazepinas. O documento duplicado deve ser devidamente assinado pelo diretor técnico ou farmacêutico substituto, carimbado e enviado para o respetivo fornecedor, enquanto que o documento original deve ser arquivado na farmácia por um período de três anos. A *Plural+Udifar* permite realizar este procedimento *online*.

Durante as primeiras semanas de estágio curricular, a recepção de encomendas foi uma das primeiras atividades que realizei, o que permitiu familiarizar-me com os nomes comerciais e as respetivas substâncias ativas.

## **4.6. Estabelecimento de preços e respetiva margem de comercialização**

De acordo com o ponto 1 do artigo 103º do Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto os MSRM e os MNSRM comparticipados têm um preço fixado por decreto-lei [8]. O PVP diz respeito ao preço máximo que pode ser praticado pelas farmácias e o seu estabelecimento é da responsabilidade do INFARMED, I. P. [13]. Segundo o artigo 9º do Decreto-Lei nº 97/2015, de 1 de junho o PVP do medicamento é composto por [13]:

- PVA;
- Margem de comercialização do distribuidor grossista;
- Margem de comercialização do retalhista;
- Taxa sobre a comercialização de medicamentos;
- Imposto sobre o valor acrescentado (IVA).

Nestas situações, o PVP dos produtos abrangidos por esta legislação não pode ser alterado, até porque as margens máximas de comercialização dos distribuidores grossistas e das farmácias se encontram definidas no artigo 12º da Portaria n.º 195-C/2015, de 30 de junho, dependendo do PVA dos MSRM e MNSRM comparticipados [14]. Neste sentido, o PVP vem impresso na embalagem do produto.

O PVP dos restantes medicamentos e produtos de saúde é da responsabilidade da farmácia tendo em conta a margem de lucro decidida. Nesta situação o PVP é calculado diretamente no *Sifarma*. Para que o programa assuma automaticamente os produtos em que é necessário a impressão de etiquetas de preço, é necessário selecionar a opção “Etiqueta na Entrada” na “Ficha do Produto” de cada um. Esta operação apenas é realizada na primeira vez que o produto entra em stock. No fim da receção das encomendas as etiquetas são impressas e procede-se à respetiva etiquetagem.

## **4.7. Armazenamento**

Durante a receção de encomendas, cada produto é separado em conformidade com o stock existente na farmácia. Desta forma, durante o armazenamento consegue-se confirmar diariamente o stock dos produtos e minimizar possíveis erros.

Todos os MSRM armazenam-se fora da zona de atendimento, nos locais adequados, de acordo com a forma farmacêutica por ordem alfabética do nome comercial, princípio ativo ou laboratório (no caso de se tratar de um medicamento genérico), ordem crescente

de dosagem e de tamanho da embalagem. Os produtos que necessitam de ser armazenados no frio são colocados no frigorífico com a disposição utilizada para os MSRM. Os MNSRM são colocados nos armários de exposição na zona de atendimento ao público nas suas respetivas categorias e as matérias-primas são armazenadas no laboratório. Para minimizar erros de armazenamento, cada produto tem uma localização específica definida na ficha do produto, o que permite facilitar o armazenamento e a dispensa.

Em todos os locais da farmácia, os medicamentos e os produtos de saúde encontram-se organizados segundo o princípio FEFO “*first expire, first out*”, de forma a garantir que são dispensados primeiro os produtos que têm um prazo de validade mais curto.

A FSC dispõe ainda de duas zonas dedicadas a produtos reservados. Uma zona dedicada a produtos reservados não liquidados, devidamente identificados com o nome do utente, e outra de produtos registados e liquidados, mas que não se encontravam disponíveis na farmácia na altura em que foram solicitados.

#### **4.7.1. Controlo da temperatura e humidade**

No armazenamento dos produtos é preciso ter em consideração vários fatores que podem comprometer a sua estabilidade e segurança.

A FSC dispõe de termohigrómetros em três zonas distintas para monitorizar a temperatura e a humidade, evitando a degradação dos produtos e assegurando as condições ótimas de armazenamento. Um encontra-se no frigorífico para monitorizar os valores de humidade e temperatura dos produtos nele armazenados, outro no armazém e outro na zona de encomendas ou na zona de atendimento. É importante que a temperatura no frigorífico esteja sempre compreendida entre os 2°C e 8°C. No armazém, na zona de encomendas e na zona de atendimento a temperatura deve manter-se inferior a 25°C e a percentagem de humidade deverá ser sempre inferior a 60%.

Os registos de temperatura e de humidade do frigorífico são impressos e analisados semanalmente, enquanto que os registos do armazém, da zona de encomendas e atendimento analisam-se e imprimem-se quinzenalmente. Estes registos são validados pelo farmacêutico responsável, carimbados e arquivados na farmácia por um período de três anos. A calibração dos aparelhos é executada anualmente por uma entidade devidamente certificada.

### **4.7.2. Controlo dos prazos de validade**

O controlo inicial dos prazos de validade ocorre no momento da receção de encomendas. Como já foi referido, apenas se altera a validade dos produtos caso o stock seja zero na farmácia, ou caso a validade seja inferior à dos produtos que já estejam em stock. Na FSC foi estipulado que se deve introduzir uma validade quatro meses menor àquela que o produto apresenta.

Mensalmente é impressa uma lista no *Sifarma* que discrimina todos os produtos com prazos de validade que expiram nos três meses seguintes. Desta forma, consegue-se atualizar a validade de cada um dos produtos para a validade real e recolher todos os produtos cuja validade está perto de expirar para serem destacados.

O fornecedor principal da FSC, a *Plural+Udifar*, apenas permite a recolha de produtos de dois em dois meses. Nestes períodos de recolha apenas são aceites medicamentos cujo prazo de validade termine dentro de dois meses. Os produtos do protocolo da diabetes e os medicamentos de uso veterinário devem ser devolvidos seis meses antes de terminar o prazo de validade.

### **4.8. Devoluções**

Para se proceder a uma devolução deve-se, inicialmente, verificar o fornecedor responsável pelos produtos que se pretendem devolver. De seguida, é necessário elaborar uma nota de devolução no *Sifarma*. Nesta nota de devolução deve constar o fornecedor, todos os produtos a devolver e respetivo CNP, quantidade a ser devolvida, o número da fatura e o motivo da devolução. Entre as razões principais de devoluções de produtos aos fornecedores, encontram-se:

- Produtos cujo prazo de validade se encontre reduzido;
- Produtos que foram recebidos em encomendas já com um prazo de validade demasiado curto para ser possível o seu escoamento;
- Produtos cujas embalagens se encontravam danificadas;
- Erros em pedidos realizados nas encomendas diárias e/ou instantâneas;
- Produtos enviados por engano;
- Ordens diretas de retirada de determinados lotes de produtos por parte do INFARMED ou do próprio laboratório do qual provém o produto.

Após a aprovação da nota de devolução são impressas três vias. O original e duplicado são assinados e carimbados por um farmacêutico e enviado juntamente com os produtos

devolvidos. A via em triplicado é etiquetada com um código de barras por um representante do fornecedor e arquivada na farmácia até posterior regularização.

Na FSC, quando se pretende devolver uma grande quantidade de produtos, como os que se aproximam do prazo de validade, os medicamentos psicotrópicos e estupefacientes são devolvidos em separado pois é necessário arquivar uma segunda cópia dessa nota de devolução.

Nas devoluções que são aceites, a farmácia recebe uma nota de crédito que geralmente credita o valor cobrado à farmácia. Adicionalmente, pode receber novos produtos com prazos de validade mais alargados ou produtos diferentes dos que foram devolvidos. No entanto, quando as devoluções não são aceites, os produtos são devolvidos à farmácia com uma guia de transporte. Nestas situações, se os produtos estiverem em condições de serem escoados podem ser reintroduzidos no stock, caso contrário, são dados como quebras a fim de serem destruídos. A regularização de devoluções é realizada através do *Sifarma* onde é necessário seleccionar o número da guia, o produto e o respetivo modo de regularização.

## **5. Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento**

### **5.1. Aspetos éticos e deontológicos e informação ao utente**

No contexto de farmácia comunitária é essencial que o farmacêutico domine os princípios e técnicas que permitem a recolha e a transmissão da informação para conciliar necessidades e expectativas do utente, com a promoção do uso racional do medicamento.

O Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos apresenta alguns deveres do farmacêutico, enquanto profissional de saúde dos quais se destacam [15]:

- Garantir a máxima qualidade dos serviços prestados;
- Assegurar que o utente recebe informação correta e adequada relativamente à utilização do medicamento;
- Dever de sigilo.

Neste sentido, durante o atendimento é fundamental que se garanta a transmissão por via oral e escrita da posologia, modo de administração, precauções de utilização, contraindicações, interações, efeitos indesejáveis, indicações e duração do tratamento e que se mostre disponibilidade para esclarecer qualquer questão. Para tal, é importante que o farmacêutico tenha capacidade de adaptar o discurso a cada utente e mantenha uma linguagem simples e clara.

O farmacêutico deve ter sempre em conta “... o bem-estar do doente e do cidadão em geral, devendo pôr o bem dos indivíduos à frente dos seus interesses pessoais ou comerciais e promover o direito de acesso a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança.” [15].

## **5.2. Farmacovigilância**

A Farmacovigilância (FV) é a ciência e ações que se encontram relacionadas com a deteção, avaliação, compreensão e prevenção de reações adversas a medicamentos (RAM) ou quaisquer outros problemas relacionados com os medicamentos (PRM). A FV tem como objetivo melhorar a segurança dos medicamentos, em defesa do utente e da Saúde Pública [16], [17].

De acordo com o artigo 7º do Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto, as farmácias devem colaborar com o INFARMED na identificação, quantificação, avaliação e prevenção dos riscos do uso de medicamentos, uma vez comercializados, permitindo o seguimento das suas possíveis reações adversas [2].

Neste sentido, o farmacêutico comunitário encontra-se numa posição privilegiada para o exercício de FV, dado que não só se encontra em constante contacto com os mais diversos utentes, que muitas vezes recorrem sempre à mesma farmácia, permitindo algum acompanhamento estruturado, como também é muitas vezes o primeiro contacto do utente com o sistema de saúde, o que aumenta a probabilidade de um utente recorrer a este profissional com uma queixa de uma possível RAM. Assim, o papel do farmacêutico passa por estar atento e notificar possíveis RAM e também destacar a importância da FV aos utentes, para que eles próprios notifiquem as suas RAM.

As RAM podem ser notificadas pelos utentes ou pelos profissionais de saúde, eletronicamente no Portal RAM ou através do preenchimento de um formulário de notificação, disponível no INFARMED que deve ser enviado para o sistema nacional de FV [16]. Neste formulário, deve vir discriminado a descrição da RAM, duração,

gravidade, evolução, causalidade, tratamento da RAM, medicamento suspeito, lote, via de administração, indicação terapêutica, início e suspensão da toma do medicamento, indicação de medicamentos adicionais, dados do doente e do notificador para esclarecimento de dúvidas [18].

### **5.3. Medicamentos fora de uso – VALORMED**

A VALORMED é uma associação sem fins lucrativos na qual assenta a responsabilidade da gestão dos resíduos de medicamentos fora de uso e embalagens vazias. Neste sentido, esta associação garante a recolha e tratamento destes resíduos de forma adequada e segura contribuindo para a preservação do ambiente e proteção da saúde pública [19].

Na FSC existe um contentor da VALORMED bastante acessível e visível a todos os utentes, onde é possível depositar todos os resíduos referidos anteriormente, exceto objetos cortantes (seringas, agulhas ou canetas que possuam agulhas), termómetros, produtos químicos/detergentes, material de penso ou cirúrgico, aparelhos eletrónicos, pilhas e radiografias. Quando o contentor atinge a sua capacidade máxima, é selado e recolhido pela distribuidora, que posteriormente o transporta para um Centro de Triagem onde todos os resíduos são separados e classificados para serem entregues a gestores de resíduos autorizados responsáveis pela sua incineração ou reciclagem [20].

Como farmacêutico, é importante contribuir para a divulgação deste programa incentivando os utentes à adesão e mostrando os benefícios que tem no meio ambiente e na saúde pública. Ao longo do estágio verifiquei que havia bastante adesão a este programa. Além disso, sempre que surgiam utentes na farmácia com uma embalagem vazia para indicação do medicamento que necessitavam, encorajei a colocá-la no contentor da VALORMED aquando do término do atendimento.

### **5.4. Programa de Troca de Seringas (PTS)**

O Programa de Troca de Seringas (PTS), tem o objetivo de prevenir infeções pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e pelos vírus das Hepatites B e C, por via sexual, endovenosa e parentérica, nos utilizadores de drogas injetáveis. O PTS assegura a distribuição de material esterilizado e a recolha e destruição de material utilizado [21].

Este programa consiste na troca de duas seringas utilizadas por um kit de redução de riscos gratuito. O kit é composto por duas seringas esterilizadas, duas agulhas, dois

filtros, dois toalhetes desinfetantes, dois recipientes para preparação da droga, duas carteiras de ácido cítrico, duas ampolas de água destilada e um preservativo. As seringas utilizadas devem ser colocadas pelo próprio utilizador diretamente num contentor próprio existente na farmácia que é posteriormente recolhido e substituído pela AMBIMED [21], [22].

Como farmacêutico é importante reforçar os perigos associados à partilha de seringas, agulha ou qualquer outro material de injeção de forma a prevenir o aparecimento de doenças transmissíveis.

## 6. Dispensa de medicamentos

A dispensa de medicamentos e o controlo da sua utilização faz parte do dia-a-dia do farmacêutico comunitário. É um procedimento importante que permite ao utente acesso aos medicamentos de forma segura. O farmacêutico procede à cedência de medicamentos mediante a apresentação de receita médica ou em regime de automedicação.

O momento da dispensa revela-se de extrema importância, dado que o farmacêutico avalia toda a medicação a dispensar, identificando potenciais PRM tais como interações ou contraindicações, de forma a evitar Resultados Negativos associados à Medicação (RNM), protegendo a saúde do utente. Se for detetado algum problema com a medicação, o farmacêutico deve contactar o prescriptor [4].

Os MSRM correspondem ao grupo de medicamentos que representam risco direto ou indireto para a saúde do utente, quando utilizados sem vigilância médica e/ou para fins diferentes aos quais se destinam. Para além disso, são também classificados como MSRM todos os que sejam destinados a administração por via parentérica ou os que na sua composição contenham substâncias ou preparações à base de substâncias cuja atividade ou reações adversas ainda necessitem de aprofundamento [8]. Estes medicamentos apenas podem ser dispensados perante a apresentação de uma receita médica válida. Por outro lado, os MNSRM não se inserem em nenhuma das condições acima mencionadas, não sendo necessária a apresentação de receita médica.

### 6.1. Receitas médicas e respetiva validação

Existem três tipos principais de receitas médicas: as receitas **manuais**, as receitas **eletrónicas materializadas** (em papel) e as receitas **eletrónicas**

**desmaterializadas** (sem papel). Todas as receitas possuem especificações que devem ser validadas pelo farmacêutico face ao seu correto preenchimento, antes da dispensa dos medicamentos [23].

Atualmente, as receitas manuais representam uma pequena porção das prescrições, devido ao surgimento do Despacho nº2935-B/2016, de 25 de fevereiro, que tornou obrigatória a prescrição através da receita eletrônica desmaterializada [24]. Neste sentido, as receitas manuais apenas são aceites segundo os casos previstos no ponto 1 do artigo 8º da Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho, devendo apresentar assinalado a exceção legal aplicável: falência informática, inadaptação do prescriptor, prescrição no domicílio e limite máximo de quarenta receitas médicas por mês [23], [25].

Para validar uma **receita médica materializada ou manual**, o farmacêutico deve avaliar as seguintes especificações [23]:

- Número da receita;
- Local de prescrição;
- Identificação do médico prescriptor
- Identificação do utente (nome e número do SNS do utente e se aplicáveis o número de beneficiário da entidade financeira responsável e o regime de participação especial – letra “R” para utentes pensionistas e letra “O” para utentes abrangidos por outros regimes especiais de participação identificados por menção do respetivo diploma legal);
- Identificação da entidade financeira responsável pelo pagamento da participação;
- Duração do tratamento;
- Data da prescrição e validade;
- Identificação do medicamento por Denominação Comum Internacional (DCI) ou substância ativa, forma farmacêutica, dosagem, apresentação, Código Nacional para a Prescrição Eletrónica de Medicamentos, posologia e número de embalagens. A identificação do medicamento também pode ser realizada pela denominação comercial do medicamento nos casos em que não exista medicamento genérico participado ou para o qual só exista original de marcas e licenças; quando por razões de propriedade industrial, apenas pode ser prescrito tal medicamento para determinada situação terapêutica ou quando existe uma justificação técnica do prescriptor quanto à impossibilidade de substituição. As possíveis justificações técnicas vêm descritas na receita como [25]:

- “Exceção a) do nº3 do art. 6º”, no caso de medicamentos com margem ou índice terapêutico estreito;
- “Exceção b) do nº3 do art. 6º”, nas situações que tenha sido registada uma reação adversa prévia reportada ao INFARMED;
- “Exceção c) do nº3 do art. 6º”, nos casos de continuidade do tratamento superior a 28 dias.

De acordo com a Deliberação N.º 70/CD/2012, de 24 de maio, as substâncias ativas com margem ou índice terapêutico estreito são Ciclosporina, Levotiroxina sódica e Tacrolímus [26].

Nas **receitas manuais** deve ainda verificar-se os dados do prescritor, a aposição da vinheta e a sua assinatura, que é obrigatória. Para além disso, estas receitas não podem conter rasuras, caligrafias diferentes, nem podem ser prescritas com canetas de diferente cor ou a lápis, podendo assim não vir a ser comparticipadas [23]. Nestas situações, as receitas devem apresentar uma rúbrica do médico prescritor.

A validade das **receitas materializadas e das receitas manuais** corresponde a um prazo de trinta dias seguidos a partir da sua data de emissão. No entanto, as **receitas materializadas** podem ser renováveis com uma validade de seis meses se incluir medicamentos destinados a tratamentos de longa duração. Neste sentido, a receita é constituída por uma, duas ou três vias, cada uma com uma validade de seis meses [27].

O número máximo de embalagens prescritas nas **receitas materializadas e nas receitas manuais** é de quatro medicamentos diferentes, num total de quatro embalagens por receita, sendo que no máximo podem ser prescritas duas embalagens por cada medicamento. Nas situações em que são prescritos medicamentos de embalagem unitária, podem ser prescritas até 4 embalagens do mesmo medicamento, ou até 12 embalagens no caso de medicamentos de longa duração (divididas pelas três vias da receita materializada) [27].

As **receitas desmaterializadas**, devem conter a assinatura do médico prescritor, a hora de prescrição e ainda a indicação da validade da prescrição e número de embalagens. Neste caso, cada linha de prescrição corresponde a um medicamento, cujo número máximo de embalagens poderá variar consoante a duração do tratamento [23], [27]:

- Duas embalagens, no caso de tratamentos de curta ou média duração, ou quatro embalagens, no caso dos medicamentos prescritos se apresentarem sob a forma

## Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

de dose unitária, com uma validade de sessenta dias seguidos, a partir da sua data de emissão;

- Seis embalagens, no caso de tratamentos de longa duração, ou doze embalagens, no caso dos medicamentos prescritos se apresentarem sob a forma de dose unitária, com uma validade de seis meses, a partir da sua data de emissão;
- Em casos excepcionais, podem efetuar-se prescrições sem limite de embalagens, com uma validade de doze meses, desde que sejam devidamente fundamentadas pelo prescritor e as quantidades sejam adequadas e ajustadas à posologia instituída e à duração do tratamento.

Após a validação de cada um dos parâmetros referidos anteriormente e de realizar o aconselhamento adequado, é necessário verificar toda a medicação prestes a ser dispensada. Esta verificação é realizada no *Sifarma*, através da leitura ótica dos CNP e do dispositivo de segurança/código bidimensional impresso na cartonagem dos medicamentos abrangidos pelo Decreto-Lei n.º 26/2018, de 24 de abril [28]. Este processo permite garantir que os medicamentos dispensados correspondem aos que foram prescritos e a interceção de potenciais situações de falsificação. De seguida, as **receitas materializadas e manuais** são colocadas na impressora, para que no seu verso seja impresso o registo de faturação, que o utente deve assinar para confirmar a dispensa dos medicamentos nele descritos, e validadas pelo responsável da dispensa com a assinatura, data e carimbo da farmácia. Na FSC as receitas são organizadas por organismos e arquivadas numa gaveta para mais tarde serem novamente conferidas.

É importante referir que para cada utente, a farmácia só pode dispensar duas embalagens do mesmo medicamento, ou quatro no caso das embalagens em dose unitária, por mês. Se forem dispensadas mais embalagens é necessário justificar com as exceções legais previstas na Portaria n.º 284-A/2016, de 4 de novembro, que veio alterar o artigo 17.º da Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho [25], [29]: a quantidade de embalagens necessária para cumprir a posologia é superior a 2 embalagens por mês; extravio, perda ou roubo de medicamentos; dificuldade de deslocação à farmácia e ausência prolongada do país.

No decorrer do estágio curricular trabalhei com os vários tipos de receitas, acompanhando todo este processo.

## 6.2. Regimes de participação

No sistema de saúde português existem vários regimes de participação que permitem ao utente não pagar certos medicamentos na totalidade, sendo o restante liquidado pela entidade participante responsável.

No **regime geral**, o estado é a entidade financeira responsável pelo pagamento de uma determinada percentagem dos medicamentos comparticipados, com base em quatro escalões: A (90%), B (69%), C (37%) e D (15%). O escalão varia consoante a classificação farmacoterapêutica de cada medicamento. Esta informação pode ser consultada na Portaria n.º 195-D/2015, de 30 de junho [23], [30].

No **regime especial**, a participação abrange [23]:

- Beneficiários, onde o Estado comparticipa os medicamentos através de uma percentagem acrescida aos escalões anteriormente referidos (5% no escalão A e 15% nos restantes escalões);
- Cidadãos estrangeiros com estatuto de refugiados ou com direito de asilo em Portugal, em que o valor destes medicamentos é comparticipado na totalidade.
- Patologias ou grupos especiais de utentes, em que a participação é definida por despacho do membro do Governo responsável pela área da saúde e graduada consoante as entidades que o prescreveram, sendo que o diploma correspondente a cada patologia deve vir mencionado na receita.

Um exemplo deste último caso, é o Exelon®, medicamento para a doença de Alzheimer, em que o médico especialista (neurologista ou psiquiatra) deve indicar na receita o Despacho n.º 13020/2011, de 29 setembro para que o utente usufrua do desconto deste regime especial [31].

Os produtos destinados ao autocontrolo da diabetes mellitus, como tiras-teste para determinação de glicemia, cetonemia e cetonúria, as agulhas, seringas e lancetas utilizadas pelos utentes do Serviço Nacional de Saúde (SNS) são produtos abrangidos por um protocolo específico. Para além de terem de ser prescritos isoladamente em receitas manuais e materializadas, estão abrangidos por um regime de participação pelo Estado. Esta participação consiste em 85% do PVP das tiras-teste e sensores e em 100% das agulhas, seringas e lancetas [23].

Existem ainda medicamentos comparticipados pelos respetivos laboratórios, mas não pelo Estado, como é o caso do Vesomni® e Betmiga®. Nestes casos, é necessário proceder

à leitura ótica do código bidimensional que se encontra inscrito na cartonagem do medicamento.

Para além destes regimes, existem outros subsistemas de comparticipação de outras entidades que não o Estado, que ocorrem sob o modelo de complementaridade. Nestes casos, apesar do SNS comparticipar uma parte, o organismo da complementaridade comparticipa outra. Os beneficiários destes subsistemas devem apresentar um cartão, no qual deve estar o mesmo nome de utente que o da receita e deve também estar dentro da validade. No ato da dispensa é emitido um recibo que deve ser rubricado pelo beneficiário, onde consta informação relativa aos medicamentos comparticipados. Alguns exemplos dos organismos de complementaridade são o Sindicato dos Bancários do Centro (SAMS), Serviços Sociais da Caixa Geral de Depósitos (SSCGD) e o programa Sã-Vida EDP (SAVIDA), entre outros.

No *Sifarma*, todos os planos encontram-se listados por códigos que devem ser aplicados sempre que é apresentada uma receita manual ou materializada sem código de acesso ou de direito de opção. Alguns exemplos são o 01 para o SNS, 48 para pensionistas, que vem indicado nas receitas pela letra “R”, 45 para SNS-diplomas e 49 para SNS-pensionistas-diplomas, indicado nas receitas pela letra “O”, através do qual surge, de seguida, uma lista com os despachos e portarias existentes a seleccionar de acordo com o que vem mencionado na receita. No entanto, nas receitas onde vem mencionado o Despacho n.º 4521/2001, basta aplicar o plano 42 designado a utentes com paramiloidose, não sendo necessário seleccionar esse mesmo despacho. Os subsistemas de comparticipação também estão listados por códigos e têm de ser introduzidas manualmente no *Sifarma* em todos os tipos de receitas. Nas receitas manuais e nas receitas materializadas é ainda necessário ficar com uma fotocópia do cartão de beneficiário do respetivo organismo.

Durante o meu estágio tive oportunidade de contactar com todos estes regimes de comparticipação e realizar estes procedimentos. Além disso, verifiquei que um dos planos de comparticipação mais frequente era o dos lanifícios, que deve vir mencionado nas receitas com a Portaria n.º 287/2016. Isto acontece porque grande parte dos utentes pertence ao grupo de pensionistas que descontou para o fundo especial de segurança social do pessoal da indústria de lanifícios até 1984. Nesta situação todos os medicamentos comparticipados são pagos na totalidade pelo Estado, como descrito no artigo 2º da Portaria n.º 287/2016, de 10 de novembro alterada pela Portaria n.º 154/2018, de 28 de maio [32], [33].

### 6.3. Verificação do receituário e faturação às entidades responsáveis

A verificação do receituário é um procedimento que é realizado periodicamente de forma a garantir que a farmácia recebe a comparticipação dos medicamentos. No ato da dispensa, as receitas manuais e materializadas são verificadas, validadas e arquivadas numa gaveta onde estão organizadas de acordo com o organismo responsável pela comparticipação, tal como foi referido anteriormente. No fim do mês, o farmacêutico responsável, repete o procedimento de validação em todas as receitas manuais e materializadas, minimizando erros que possam impedir o reembolso das comparticipações.

O processamento do receituário é realizado através do programa *Sifarma*, que atribui o lote e o número sequencial da receita aquando do atendimento, consoante o organismo do qual o utente é beneficiário. Cada lote é constituído por 30 receitas. No fim do mês, são impressos, carimbados e assinados os **verbetes** de cada lote e anexados às respetivas receitas. Este documento corresponde a um resumo de todas as receitas que constituem o lote, com informação relativa ao número de embalagens que constam em cada receita, o montante total em PVP, o encargo ao utente e o valor participado pela entidade responsável. É também emitida a **relação de resumo de lotes** que constitui um resumo de todos os verbetes de lote emitidos para uma determinada entidade e a **fatura mensal de medicamentos** que contém os valores totais faturados para os regimes de comparticipação de cada uma das entidades.

As receitas eletrónicas materializadas com código de acesso e de opção entram no sistema em dois lotes distintos:

- Lote 99 – receitas materializadas dispensadas com sucesso na validação;
- Lote 98 – receitas materializadas dispensadas sem sucesso na validação.

Nas receitas materializadas sem estes códigos, tem de ser atribuído um plano de comparticipação de forma manual e as receitas separam-se de acordo com esse plano.

As receitas eletrónicas desmaterializadas são enviadas automaticamente para o Centro de Conferências de Faturas da Maia (CCF) de acordo com lote atribuído:

- Lote 97 – receitas desmaterializadas dispensadas com sucesso na validação;
- Lote 96 – receitas desmaterializadas dispensadas sem sucesso na validação.

Estes lotes não têm número máximo de receitas.

No fim do processamento do receituário procede-se ao seu envio. A porção do receituário correspondente ao SNS é enviada para o CCF, enquanto que o receituário correspondente aos restantes organismos é enviado para a ANF, que o reenvia para cada entidade correspondente. Por fim, a ANF envia à farmácia o valor reembolsado das participações. Se as entidades participantes verificarem algum erro na validação das receitas, estas são devolvidas à farmácia que tem um prazo máximo de 60 dias para corrigir os erros e reenviar as faturas [34].

#### **6.4. Dispensa de estupefacientes e psicotrópicos**

Os psicotrópicos e estupefacientes encontram-se discriminados nas tabelas I e II do Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, no ponto 1 do artigo 86.º do Decreto-Regulamentar n.º 61/94, de 12 de outubro e na respetiva legislação que procedeu às suas alterações [35], [36].

Nas receitas eletrónicas materializadas e nas receitas manuais, estes medicamentos têm de ser prescritos de forma isolada. Nas receitas eletrónicas desmaterializadas podem ser prescritos com outros medicamentos e produtos de saúde. [23] Durante o atendimento, esta medicação apenas pode ser dispensada mediante a apresentação de uma receita médica válida. Adicionalmente, o *Sifarma 2000* solicita a introdução dos dados do utente (nome, morada, código postal) e da pessoa adquirente (nome, morada, código postal, data de nascimento, número da identificação e data de validade da mesma) que têm de ter mais de 18 anos de idade [23]. Ao terminar a venda, o sistema imprime um talão com os dados inseridos e com identificação da farmácia, do dispensador, n.º da prescrição, medicamento dispensado, respetiva quantidade, n.º de conferência de faturas, o n.º de registo e data da dispensa. Este talão é devidamente arquivado numa gaveta por ordem de dispensa até ser revisto no fim do mês. As receitas manuais e materializadas, são fotocopiadas e arquivadas com o respetivo talão de dispensa.

Periodicamente, a farmácia tem de realizar um controlo sobre as entradas e saídas destes medicamentos. Mensalmente, até ao dia 8 do mês seguinte, a FSC envia ao INFARMED, através do *Sifarma*, o registo de saídas de estupefacientes e psicotrópicos e, se aplicável, uma cópia das respetivas receitas manuais e materializadas. Anualmente, até dia 31 de janeiro do ano seguinte, é enviado o mapa de balanço de entradas e saídas de medicamentos estupefacientes e psicotrópicos, onde deve ainda estar incluídas as benzodiazepinas [37]. As cópias das receitas e os talões de dispensa são organizados por ordem da data de aviamento e arquivados juntamente com o registo de saídas, o registo de entradas e os mapas de balanço na farmácia durante um período de três anos.

## 6.5. Dispensa de genéricos

De acordo com a Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho, as farmácias devem ter disponíveis, no mínimo, três medicamentos com a mesma substância ativa, forma farmacêutica e dosagem, que devem corresponder aos cinco preços mais baixos de cada grupo homogêneo. Neste sentido, o farmacêutico deve informar sobre a existência de medicamentos similares ao prescrito e com preço mais baixo para que o utente possa exercer o seu direito de opção. Se na receita estiver mencionada a exceção a) ou b) do n.º 3 do artigo 6º o utente fica impedido de exercer o seu direito de opção, enquanto que se estiver mencionada a exceção c) o utente pode optar por medicamentos similares com um preço inferior ao prescrito [25].

## 6.6 Automedicação e aconselhamento

A automedicação é “a utilização de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) de forma responsável, sempre que se destine ao alívio e tratamento de queixas de saúde passageiras e sem gravidade, com a assistência ou aconselhamento opcional de um profissional de saúde” [38].

Atualmente, a automedicação é uma prática cada vez mais habitual por existir uma elevada disseminação de toda o tipo informação com acesso facilitado e pelo facto de muitos dos MNSRM não se encontrarem somente disponíveis nas farmácias, o que facilita e promove muito este comportamento. No entanto, esta prática poderá comportar riscos sérios para a saúde dos utentes quando realizada de forma incorreta.

Devido ao fácil acesso dos MNSRM, surgiu uma “Terceira Lista” que inclui medicamentos para os quais não é preciso receita médica, mas que só podem ser dispensados em farmácia (MNSRM-EF), sendo assim a sua aquisição condicionada pela intervenção de um farmacêutico por requererem uma atenção especial devido ao seu perfil de segurança [39].

O farmacêutico, sendo especialista do medicamento, constitui um agente fundamental no processo de automedicação, para orientar o utente face à utilização, ou não, de um determinado medicamento sob indicação adequada e segundo os princípios que regem o uso racional do medicamento [4], [40].

O farmacêutico deve certificar-se que possui informação suficiente para a avaliação adequada do problema de saúde apresentado pelo utente. Neste sentido, deve colocar questões ao utente nomeadamente quais os sintomas e a sua duração, se já foi realizado algum tratamento ou tomada alguma medicação para os sintomas descritos, se tem outros problemas de saúde existentes e qual a medicação habitual. Assim, o farmacêutico deve avaliar se a sintomatologia descrita está associada a alguma patologia grave, e referenciar ao médico, ou se está associada a um problema de saúde menor, realizar a dispensa de MNSRM adequado, optar pelo aconselhamento de medidas não farmacológicas, ou ambos [4].

As situações passíveis de automedicação encontram-se no anexo do Despacho n.º 17690/2007, de 23 de julho, que devem de ser problemas de saúde de carácter não grave, autolimitante e de curta duração [4], [38].

A dispensa dos MNSRM deve ser sempre acompanhada de informação relativa ao seu modo de administração, posologia, respetiva duração do tratamento, possíveis reações adversas e precauções de utilização [4].

No decorrer do meu estágio, ao familiarizar-me com os MNSRM, fui tomando consciência do vasto conhecimento que é necessário para intervir numa situação de automedicação. Além disso, tive a oportunidade de realizar vários aconselhamentos na prática da automedicação em situações como diarreia, flatulência, obstipação, vômito, azia, rinorreia, congestão nasal, tosse, verrugas, acne ligeiro a moderado, febre, constipações, herpes labial, ansiedade ligeira temporária, cefaleias ligeiras a moderadas, dores musculares ligeiras a moderadas, candidíase vaginal, higiene vaginal e contraceção de emergência.

## **7. Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde**

Para além dos produtos abordados nas secções anteriores, a farmácia possui diversos produtos de saúde ao dispor do utente, tais como produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene; produtos fitoterapêuticos e suplementos nutricionais; medicamentos de uso veterinário; dispositivos médicos e produtos dietéticos para alimentação especial.

## **7.1. Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene**

Os produtos cosméticos são de acordo com o Decreto-Lei nº189/2009, de 24 de setembro “*qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as diversas partes superficiais do corpo humano, designadamente epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos, ou com os dentes e as mucosas bucais, com a finalidade de, exclusiva ou principalmente, os limpar, perfumar, modificar o seu aspeto, proteger, manter em bom estado ou de corrigir os odores corporais*” [41].

A FSC possui ao dispor dos utentes uma grande variedade de produtos de diversas marcas, como por exemplo: Lierac®, Vichy®, Avène®, Bioderma®, La Roche Posay®, Ducray®, ISDIN®, CeraVe®, Á-Derma®, D’Aveia®, Neutrogena®, entre outros.

Neste sentido, cada marca possui diversas gamas com indicações distintas, nomeadamente: pele atópica, pele seca e muito seca, pele sensível e intolerante, pele oleosa, pele com tendência acneica, pele predisposta a vermelhidões e cuidados antienvhecimento. Estes tipos de produtos incluem essencialmente produtos de limpeza e hidratação do rosto e do corpo.

Existem também gamas capilares dedicadas à higiene que diferem de acordo com o tipo de cabelo a que se destinam, seco ou oleoso. Além disso, dentro da gama dos capilares ainda existem produtos para patologias como a psoríase e a dermatite seborreica, para a perda de densidade, prurido, queda e caspa.

Relativamente aos produtos de higiene, estão incluídos os geles de banho corporal, geles de higiene íntima e desodorizantes. Os produtos de higiene dentária também possuem uma elevada procura na FSC, como é o caso de diversas pastas de dentes e colutórios.

Durante o atendimento é essencial que o farmacêutico coloque questões ao utente, com o objetivo de identificar o problema e avaliar se é necessário ser referenciado ao médico (ou médico-dentista) ou se a situação é passível de ser resolvida com a aplicação de um cosmético. Neste sentido, o farmacêutico deve reconhecer e dominar todos os produtos presentes na farmácia de forma a indicar o cosmético mais adequado para determinada situação.

No decorrer do estágio curricular, esta área foi a que se mostrou mais desafiante, não só pela variedade de produtos, mas também por serem bastante solicitados. Os produtos mais solicitados foram produtos de hidratação e higiene diária, acne, peles secas e atópicas. No período final do estágio houve um aumento na procura de produtos de proteção solar devido à aproximação da época balnear.

## 7.2. Fitoterapia e suplementos alimentares

Produtos fitoterapêuticos ou medicamentos à base de plantas são todos os medicamentos que tenham “*exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas*” [8]. Na FSC deparei-me com várias situações que tive de recorrer a estes produtos, tais como problemas com o sono, ansiedade e stress. Assim alguns dos produtos existentes para estas situações são os produtos da marca Arkopharma® e Valdispert®.

Os suplementos alimentares são “*géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico ... que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida.*” [42]. Na FSC, a procura destes produtos recaía sobre a diminuição do cansaço e da fadiga, aumento da concentração e da memória e melhoria dos problemas musculares, dores nas articulações e infeções urinárias recorrentes. Exemplos destes são Centrum®, Viterra®, Cerebrum®, Yperton®, Varimine Magnesium AP®, Moviartrorse®, Lactoflora Uro® e Cistisil®.

## 7.3. Medicamentos de uso veterinário

Um medicamento de uso veterinário (MUV) consiste em “*toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no animal com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas*”. Os MUV devem encontrar-se bem identificados pela menção “USO VETERINÁRIO” impressa, de forma destacada, a fundo verde [43].

Durante o meu período de estágio tive a oportunidade de participar na criação de um linear de exposição exclusivo para MUV, com desparasitantes internos e externos e coleiras antiparasitárias. Alguns exemplos são: Drontal®, Anthelmin®, Dehinel®, Amflee®, Advantix® e Scalibor®. Além disso, fora da zona de atendimento ao público a FSC também dispõe de pilulas anticoncepcionais para cães e gatos, tais como Pilusoft® e Megecat®.

A seleção dos MUV e a dosagem deve ser sempre realizada tendo em conta o animal, a idade, e o peso corporal.

## 7.4. Dispositivos médicos

Segundo o Decreto-Lei nº145/2009, de 17 de junho, entende-se por dispositivo médico “qualquer instrumento, aparelho, equipamento, software, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação (...), cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios” [44]. Os dispositivos médicos devem apresentar a marcação CE, de modo a comprovarem a sua conformidade com os requisitos legais [45].

Os dispositivos médicos encontram-se agrupados em quatro classes distintas de acordo com a vulnerabilidade do corpo humano e com os potenciais riscos decorrentes da sua conceção técnica e do fabrico. Alguns dos exemplos de dispositivos na FSC são [44]:

- Classe I (baixo risco): sacos coletores de urina, sacos para ostomia, fraldas e pensos para incontinência, colares cervicais, meias de compressão, canadianas, ligaduras e algodão hidrofílico;
- Classe IIa (médio risco): termómetros, medidores de tensão, agulhas, lancetas e compressas de gaze hidrófila esterilizadas ou não esterilizadas;
- Classe IIb (médio risco): soluções de conforto para portadores de lentes de contacto, preservativos masculinos, canetas de insulina e material de penso para feridas que fissuraram a derme de forma substancial e extensa;
- Classe III (alto risco): pensos com medicamentos.

Na FSC existem ainda dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, como testes de gravidez, tiras para a medição da glicémia e frascos para a colheita de amostras.

Durante a dispensa destes produtos é essencial explicar ao utente como os utilizar corretamente.

## 7.5. Produtos dietéticos para alimentação especial

Os géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial são “*géneros alimentícios sujeitos a processamento ou formulação especial, com vista a satisfazer as necessidades nutricionais de pacientes e para consumo sob supervisão médica, destinando-se à alimentação exclusiva ou parcial de pacientes com capacidade limitada, diminuída ou alterada para ingerir, digerir, absorver, metabolizar ou excretar géneros alimentícios correntes ou alguns dos nutrientes neles contidos ou os seus metabólicos, ou cujo estado de saúde determina necessidades nutricionais particulares que não géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial ou por combinação de ambos*” [46].

Deste modo, estes produtos devem corresponder às necessidades nutricionais especiais de [47]:

- Pessoas em que o processo de assimilação ou metabolismo se encontrem perturbados;
- Pessoas que se encontram em condições fisiológicas especiais e que podem retirar benefícios especiais de uma ingestão controlada de determinadas substâncias contidas nos alimentos;
- Lactentes ou crianças de pouca idade em bom estado de saúde.

Na FSC existem alguns produtos destinados a indivíduos com problemas de deglutição e perdas de peso acentuadas, como Fortimel® e Resource®.

### 7.5.1. Produtos dietéticos infantis

No mercado existem vários produtos com objetivo de substituírem o aleitamento materno como os leites para lactentes (0 a 6 meses), leites de transição (6 a 12 meses) e leites de crescimento (12 a 48 meses) [48]. Dentro destas categorias existem ainda leites adaptados a diferentes situações como a regurgitação, intolerância ou alergia à lactose, existência de problemas gastrointestinais (obstipação, diarreia, cólicas ou refluxo gastroesofágico) e ainda a gama para lactentes com tendência para desenvolvimento de alergias [48].

O Decreto-Lei n.º 62/2017, de 9 de junho declara que não é permitida a publicidade, a realização de promoções ou oferta de amostras de fórmulas para lactentes, com objetivo de promover o aleitamento materno e os seus inúmeros benefícios [49]. Assim, o

aleitamento materno deve ser sempre o mais indicado, a não ser que ocorram determinados acontecimentos relacionados com a saúde do lactente ou da mãe que constituam razões médicas aceitáveis para o uso destes substitutos.

Na dispensa de produtos dietéticos infantis, o farmacêutico deve aconselhar relativamente ao modo de preparação, conservação, utilização e referir a importância da esterilização de biberões e chupetas. Na FSC os produtos mais requisitados são maioritariamente da gama NAN da Nestlé®.

## **8. Cuidados de saúde prestados na FSC**

Para além da dispensa de medicamentos, a farmácia comunitária constitui um espaço de prestações de cuidados de saúde. Na FSC, a determinação da glicémia capilar e do colesterol total decorre no gabinete de atendimento personalizado. A determinação do peso, da altura, do IMC e da pressão arterial é realizada na zona de atendimento por um equipamento de medição automática.

### **8.1. Determinação da glicémia capilar**

A Diabetes Mellitus (DM) é uma perturbação metabólica, caracterizada por uma hiperglicemia crónica. Assim, é importante determinar os valores da glicémia periodicamente de forma a impedir complicações vasculares e neuropáticas graves.

Antes de se iniciar a medição é necessário questionar o utente se está em jejum ou há quantas horas comeu, uma vez que a determinação é mais fiável se este se encontrar em jejum. De seguida, procede-se à desinfeção do dedo. Faz-se uma picada com uma lanceta e recolhe-se uma pequena amostra de sangue para uma tira-teste já inserida no aparelho de medição. Caso seja necessário, pode aquecer-se o dedo, especialmente no inverno, de forma a melhorar a circulação e facilitar a recolha da amostra.

Após a medição interpreta-se o resultado obtido de acordo com os valores na Tabela 9. Caso os valores não se encontrem dentro do normal, o farmacêutico deve encaminhar o utente para o médico com objetivo de fazer as intervenções necessárias. É importante sempre fazer o aconselhamento adequado, nomeadamente a prática de exercício físico e a adoção de uma dieta equilibrada com a diminuição da ingestão de hidratos de carbono.

No final da determinação, os resíduos biológicos e o material corto-perfurante são descartados para os contentores adequados.

**Tabela 9** - Valores de referência da glicemia [50].

	<b>Jejum (mg/dl)</b>	<b>Ocasional (mg/dl)</b>
<b>Normal</b>	<110	<140
<b>Tolerância diminuída</b>	≥110 e <126	≥140 e <200
<b>Diabetes Melitus</b>	≥126	≥200

## 8.2. Determinação de colesterol total

O colesterol é um lípido constituinte do corpo humano essencial para diversas funções importantes, como a manutenção da integridade das membranas celulares, ou o papel na formação de bÍlis e no metabolismo de vitaminas lipossolúveis. Quando os valores se encontram alterados podem surgir várias complicações cardiovasculares como a aterosclerose sendo importante a sua monitorização.

Aquando da medição, é necessário desinfetar o local da punção com álcool a 70% (v/v) para evitar que as gorduras na superfície da pele alterem os resultados. De seguida, faz-se uma picada no dedo com uma lanceta. A obtenção da amostra de sangue é realizada com um capilar e é inserida numa tira-teste que, posteriormente, é colocada no equipamento Reflatron Plus® para fazer a medição do colesterol. Se necessário, deve-se realizar a técnica de aquecimento utilizada na determinação da glicémia. Todos os resíduos são descartados para os contentores adequados.

O farmacêutico interpreta o resultado de acordo com o valor de referência, sendo que o colesterol total deve ser inferior a 190 mg/dl, e realiza o aconselhamento adequado [51]. É importante reforçar todas as medidas não farmacológicas como o exercício físico, dieta pobre em gorduras, cessação tabágica, diminuição do consumo de álcool e da ingestão de sal. Caso o utente apresente um valor pouco superior ao de referência pode ser aconselhado suplementos que contenham arroz vermelho, se não tiver uma terapêutica já instituída. Se o colesterol se encontrar muito superior ao normal deve-se referenciar o utente ao médico.

### **8.3. Determinação de peso corporal, altura, IMC e pressão arterial**

Embora por si só o IMC não seja suficiente para o diagnóstico de obesidade, é um razoável indicador do risco que o excesso de peso acarreta para doenças como DM tipo II, Hipertensão Arterial (HTA) e Dislipidemias. É calculado com base no peso e na altura de um indivíduo e é indicador dos valores de peso ideal. No entanto, independentemente do resultado do cálculo de IMC, o farmacêutico deve sempre incentivar a prática regular de exercício físico e de uma alimentação saudável e equilibrada. Na FSC a medição do peso, altura e do IMC é realizada num equipamento de medição automática. Adicionalmente, este equipamento permite a medição da percentagem de massa gorda, exceto em pessoas que tenham um *pacemaker* ou mulheres grávidas.

Sendo a HTA problema muito prevalente e que apresenta sério risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais, é fundamental que haja um seguimento frequente dos níveis de PA por parte de qualquer indivíduo. A HTA caracteriza-se por elevações persistentes na Pressão Arterial Sistólica (PAS)  $\geq 140$  mmHg e/ou da Pressão Arterial Diastólica (PAD)  $\geq 90$  mmHg, em diferentes medições e em diferentes situações do dia-a-dia. A PA deve ser medida num ambiente calmo e deve-se evitar fumar, tomar café ou fazer qualquer tipo de atividade física previamente à medição. Na FSC, este parâmetro é também medido num equipamento de medição automática. Caso seja necessário, a medição pode ser realizada no gabinete de atendimento personalizado utilizando um esfigmomanómetro digital.

De acordo com os valores na Tabela 10, o farmacêutico deve intervir apelando às medidas não farmacológicas, especialmente a diminuição do consumo de sal e a cessação tabágica. Se os valores não se encontrarem controlados, o utente deve ser referenciado ao médico com objetivo de iniciar terapia farmacológica ou alterar a terapêutica já instituída.

**Tabela 10** - Valores de referência da pressão arterial [52].

<b>Grau de HTA</b>	<b>Valores de PAS (mmHg)</b>		<b>Valores de PAD (mmHg)</b>
<b>Ótima</b>	<120	e	<80
<b>Normal</b>	120-129	e/ou	80-84
<b>Normal Alta</b>	130-139	e/ou	85-89
<b>HTA Grau I</b>	140-159	e/ou	90-99
<b>HTA Grau II</b>	160-179	e/ou	100-109
<b>HTA Grau III</b>	≥180	e/ou	≥110
<b>Hipertensão Sistólica Isolada</b>	≥140	e	<90

## 9. Preparação de medicamentos

### 9.1. Medicamentos manipulados

A manipulação dos medicamentos é necessária em situações que não esteja disponível no mercado uma terapia que satisfaça as necessidades de um determinado doente.

A preparação de medicamentos manipulados ocorre no laboratório da FSC e segue todas as normas de boas práticas estabelecidas na portaria n.º 594/2004, de 2 de julho, relativas ao pessoal, instalações e equipamentos, documentação, matérias-primas, materiais de embalagem, manipulação, controlo de qualidade e rotulagem. A preparação pode ser realizada pelo diretor técnico ou por alguém sob a sua supervisão [53].

Todas as matérias-primas a usar na preparação de medicamentos manipulados devem satisfazer as exigências da respetiva monografia na Farmacopeia e ser adquiridas a fornecedores devidamente autorizados pelo INFARMED [53].

Durante o estágio tive a oportunidade de participar ativamente na recolha de informação, preenchimento da ficha de preparação, cálculo do PVP e de prestar auxílio na preparação de um creme de permetrina a 5% (m/m) (Anexo I e II), sempre sob supervisão. Para preparar este manipulado segui uma técnica de manipulação que tive de solicitar ao LEF, a qual foi posteriormente arquivada na farmácia. Para além disso, foi necessário registar o movimento das matérias-primas utilizadas e as respetivas quebras no *Sifarma 2000*. No final da preparação realizaram-se todos os ensaios de controlo de qualidade exigidos, o acondicionamento e a rotulagem. O rótulo deve incluir a identificação da farmácia, do diretor técnico, o nome do utente no caso de se tratar de

uma fórmula magistral, o PVP, o número de lote, a fórmula do medicamento, prazo de utilização, posologia e instruções especiais de utilização [53].

O cálculo do PVP dos medicamentos manipulados é realizado recorrendo a uma fórmula que envolve o valor de aquisição das matérias-primas, material de acondicionamento e o valor dos honorários de manipulação, como descrito na Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho [54]. De acordo com o Despacho n.º 18694/2010, de 12 de dezembro, apenas são participados os medicamentos manipulados que satisfaçam uma das seguintes condições [55]:

- Não exista no mercado a especialidade farmacêutica com igual substância ativa na forma farmacêutica pretendida;
- Existência de lacuna terapêutica a nível dos medicamentos preparados industrialmente;
- Necessidade de adaptação de dosagens ou formas farmacêuticas às carências terapêuticas de populações específicas, como é o caso da pediatria ou da geriatria.

Os medicamentos manipulados que se encontram em anexo do referido despacho são participados em 30% do respetivo preço [55].

Toda a documentação da preparação dos manipulados deve ser arquivada na farmácia por um período de três anos.

## **9.2. Preparações extemporâneas**

Existem certas formulações que, por apresentarem um nível baixo de estabilidade, têm de ser reconstituídas no ato da dispensa. Podem apresentar-se sobre a forma de grânulos ou pós liofilizados que após a adição de água purificada originam soluções ou suspensões.

Durante o estágio efetuei várias preparações, sendo as mais comuns os pós para suspensão oral, nomeadamente antibióticos para uso pediátrico como o Clamoxyl®. Nestas situações é importante dizer ao utente para agitar antes da utilização, a validade após a reconstituição e, se for o caso, conservar em ambiente refrigerado.

## **10. Pandemia COVID-19**

### **10.1. Vírus SARS-CoV-2**

O vírus SARS-CoV-2 (síndrome respiratória aguda grave - coronavírus 2) é o agente etiológico que dá origem a uma patologia respiratória, pneumonia, designada por COVID-19 [56]. O vírus transmite-se diretamente através de gotículas respiratórias de pessoas infetadas ou indiretamente através de objetos ou superfícies contaminadas.

No dia 11 de março de 2020 a OMS declarou que estaríamos perante uma Pandemia, o que obrigou a implementação de medidas de prevenção e segurança no quotidiano das pessoas e que levou a uma readaptação de comportamentos e atitudes [57]. Neste capítulo vou abordar as principais alterações que vivenciei no decorrer do meu estágio.

### **10.2. Medidas de proteção e prevenção implementadas na FSC**

Devido à pandemia, tiveram de ser impostas medidas com o objetivo de minimizar o risco de contágio entre os utentes e os profissionais de saúde. Assim, na FSC foram adotadas as seguintes medidas de contenção:

- Limitação máxima de quatro utentes no interior da farmácia;
- Uso obrigatório de máscara no interior da farmácia;
- Instalação de acrílicos nos balcões de atendimento;
- Desinfecção dos balcões e dos terminais multibanco após cada atendimento, sempre que possível;
- Higienização frequente das mãos, especialmente entre atendimentos;
- Instalação de dispensador de álcool em gel à entrada da farmácia;
- Evitar ao máximo o contacto com os bens pessoais dos utentes durante o atendimento;
- Desinfecção das baques antes de entrarem para a zona de receção;
- Desinfecção das maçanetas das portas, pegas de gavetas, autoclismos, interruptores de luz, impressoras e computadores de uso comum várias vezes durante o dia.

### **10.3. Turno de serviço permanente**

Na FSC o turno de serviço permanente também sofreu alterações devido à pandemia. Neste sentido, a farmácia apenas se encontra aberta até às 21h quando realiza este turno. Após essa hora até às 9h do dia seguinte o utente deve contactar a linha 1400 – SAFE (Serviço de Assistência Farmacêutica) para a dispensa de medicamentos urgentes. De seguida, o operador da linha entra em contacto com o profissional responsável pelo turno de serviço permanente para o pedido ser satisfeito [58].

Esta linha é gratuita e funciona 24 h por dia, sete dias por semana. O utente pode não só deslocar-se a farmácia que esteja a realizar o turno de serviço permanente como também a qualquer outra farmácia aderente [58].

### **10.4. Dispensa de medicamentos hospitalares**

De forma a limitar as deslocações por parte dos utentes ao hospital e a reduzir o risco de exposição à doença, a 7 de abril saiu o Despacho n.º 4270-C/2020 que aprova a cedência de medicamentos de uso hospitalar nas farmácias comunitárias ou ao domicílio, que apenas podiam ser dispensados em regime ambulatorio de farmácia hospitalar. A entrega destes medicamentos à farmácia é da responsabilidade dos distribuidores grossistas [59].

Durante o meu estágio na FSC tive a oportunidade assistir à dispensa destes medicamentos hospitalares. A FSC seguiu o fluxograma de intervenção cedido pelo CEDIME (Anexo III).

### **10.5. Dispensa de Autoteste COVID-19**

De acordo com a Portaria n.º 56/2021, de 12 de março foi estabelecido um regime excecional e temporário para a realização e introdução no mercado nacional de autotestes de testes rápidos de antigénio do SARS-CoV-2, destinados a amostras da área nasal anterior interna para utilização por não profissional [60]. Os autotestes deste regime excecional têm de ser aprovados pelo INFARMED, onde se encontram listados [61].

Durante o estágio curricular o autoteste dispensado foi o da Genrui®, sendo muitas vezes solicitado pelos utentes. Nestas situações é importante transmitir ao utente a maneira correta de realizar o teste, como ler o resultado do teste e que medidas deve tomar caso seja positivo ou negativo. Na FSC era oferecido um folheto ao utente que explicava todas

as informações inerentes à utilização do teste, nomeadamente o dever de comunicação de um resultado positivo ao Centro de Contacto SNS24 ou o registo de um resultado negativo num formulário eletrónico [62].

## **10.6. “Programa de testagem CVP – Ensino Superior” – Universidade da Beira Interior**

Durante os dias 19 de abril a 14 de maio de 2021 decorreu na Universidade da Beira Interior uma atividade, em articulação com a Cruz Vermelha Portuguesa (CVP), com o objetivo de testar alunos, docentes, investigadores e funcionários da universidade. Esta atividade decorreu diariamente alternando entre a Faculdade de Ciências Sociais e Humanas, o Pavilhão Desportivo, a Fábrica do Moço, a Faculdade de Engenharia e a Faculdade de Ciências de Saúde [63].

Esta atividade, de carácter voluntário e gratuito, foi proposta aos alunos finalistas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), despertando o meu interesse não só por ser uma atividade interessante, como também pela oportunidade de prestar auxílio na etapa crítica que era o regresso às atividades presenciais na universidade.

A equipa era composta por um supervisor, pelo apoio técnico, do qual faziam parte os alunos finalistas do Mestrado Integrado em Medicina (MIM) e MICF, pelo apoio administrativo e pelo apoio técnico e logístico.

Neste capítulo vou descrever todas as fases que experienciei no decorrer desta atividade.

### **10.6.1. Registo e Validação**

Nesta primeira etapa, os alunos eram responsáveis por receber todas as pessoas que pretendessem realizar o rastreio, prestar todas as informações necessárias e verificar se todos os dados dos voluntários estavam inseridos corretamente nos formulários, como a data de nascimento, o número do documento identificativo, número de identificação fiscal e número de utente do SNS. Adicionalmente, no formulário constava uma autorização para recolha e tratamento de dados pessoais e um consentimento informado, os quais tinham de estar assinados. Além disso, nesta fase era atribuído um número identificativo a cada voluntário para posteriormente receberem o resultado do teste.

### **10.6.2. Preparação, Recolha e Processamento**

Antes de se proceder à recolha da amostra, era necessário encher os tubos de extração com um fluído tampão até à linha de enchimento do tubo. De seguida, colocava-se uma etiqueta com o número identificativo no tubo de extração e procedia-se à recolha da amostra através de *swab* nasofaríngeo. A colheita do exsudado da nasofaringe era apenas realizada por profissionais devidamente qualificados ou por alunos finalistas do MIM, sob a sua supervisão.

Na fase do processamento, cada dispositivo de teste era etiquetado com o número identificativo e eram dispensadas verticalmente 5 gotas da amostra contidas no tubo de extração para a cavidade do dispositivo. Por fim, registava-se a hora de leitura do teste.

### **10.6.3. Leitura do resultado e envio da comunicação**

A leitura do teste decorria entre os 15 e os 20 minutos após a sua realização:

- Resultado negativo – Presença apenas da linha de controlo e nenhuma linha de teste;
- Resultado positivo – Presença da linha de controlo e da linha de teste;
- Resultado inválido – Linha de controlo não se encontra visível.

No caso do resultado ser positivo, a pessoa era imediatamente contactada para repetir o teste ou para ser encaminhada a realizar um teste PCR de modo a confirmar o resultado. No caso do teste ser negativo, o resultado era enviado no final do dia por e-mail.

Na última fase, eram introduzidos, num documento Excel, os dados pessoais dos voluntários juntamente com o resultado, qual o teste realizado e o lote. Esta informação era enviada à CVP que, posteriormente, fazia a comunicação ao Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica (SINAVE).

### **10.6.4. Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device (Nasopharyngeal)**

Durante a realização do rastreio na universidade foi utilizado este teste rápido de diagnóstico *in vitro* para deteção qualitativa do antígeno SARS-CoV-2 em amostras de

esfregaço nasofaríngeo humano da marca Abbott®. Este teste é destinado apenas para uso profissional, como auxiliar no diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2. É importante referir que o teste apenas fornece um resultado preliminar, sendo que um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção. Este teste apresenta sensibilidade de 91,4% e especificidade de 99,8% [64].

## **11. Formação contínua**

Atualmente, a informação científica encontra-se em constante evolução e atualização devido à existência crescente de recursos que permitem o avanço da investigação científica. Assim, a formação contínua é uma obrigação profissional do farmacêutico, no sentido de prestar um serviço de qualidade e excelência, com informação credível e fidedigna, a fim de satisfazer as necessidades de cada utente [4]. A formação contínua pode ser assegurada de diversas maneiras, tais como: frequência de cursos de formação científica e técnica, simpósios, congressos, sessões clínicas internas da farmácia, e ainda a leitura de publicações que contribuam para a sua atualização profissional e reforço das suas competências, entre outras [4].

A situação pandémica da COVID-19 impediu a realização de formações presenciais. No entanto, durante o estágio, tive a oportunidade de participar em vários *webinar*, nomeadamente da Bayer® sobre saúde íntima feminina, alergias e cuidado ocular e saúde da pele e dos pés e da Aboca® sobre a síndrome do intestino irritável. Além disso, tive a oportunidade de contactar com vários delegados de diversos laboratórios sobre a promoção de novos produtos e informações relativas a produtos já comercializados.

## **12. Conclusão**

O estágio curricular em farmácia comunitária foi, sem dúvida, uma etapa fulcral do meu percurso no MICEF. Não só me permitiu colocar em prática todo o conhecimento teórico adquirido ao longo do curso, como também a aquisição de novas competências técnicas, científicas e sociais. Além disso, permitiu-me contactar diretamente com a realidade da profissão e com o enquadramento das farmácias na sociedade.

O dia-a-dia do farmacêutico comunitário pode ser tão gratificante como desafiante. Sendo muitas vezes a primeira porta para o sistema de saúde, existe uma variedade de situações que vão surgindo diariamente. Neste sentido, o contacto com a profissão obrigou-me a procurar estar sempre atualizado e a enfrentar diversas situações que me deram oportunidade de crescer e desenvolver novas aptidões, como a comunicação interpessoal, aprendendo a trabalhar em ambiente profissional e a transmitir informação de forma concisa e eficaz ao utente.

Na FSC, foi-me permitido passar por todas as vertentes da farmácia, tanto em aspetos burocráticos, organizacionais e de gestão, como no cuidado pelo utente e aspetos diretamente relacionados com o medicamento. Deixo assim, um enorme agradecimento a toda a equipa, por toda a atenção e disponibilidade durante este período de aprendizagem e por me ensinarem ferramentas que levo comigo para o meu exercício futuro da profissão farmacêutica.

### 13. Referências Bibliográficas

- [1] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 277/2012, de 12 de setembro,” *Diário da República n.º 177/2012*, pp. 1–2, 2012.
- [2] INFARMED I.P., “Decreto-Lei n.º 307/2007, de 31 de agosto, O regime jurídico das farmácias de oficina. Legislação Consolidada,” pp. 1–22, 2020.
- [3] Ministério da Saúde, “Decreto-Lei n.º 171/2012, de 1 de agosto,” *Diário da República n.º 148/2012, Série I*, pp. 1–16, 2012.
- [4] Ordem dos Farmacêuticos, *Boas Práticas Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF)*, 3ª Edição. Concelho Nacional de Qualidade, 2009.
- [5] INFARMED I.P., “Deliberação n.º 1502/2014, de 30 de julho,” *Diário da República n.º 145/2014, Série II*, pp. 1–2, 2014.
- [6] Ministério da Saúde, “Deliberação n.º 1500/2004, de 7 de dezembro,” *Diário da República n.º 303/2004, Série II*, p. 1, 2004.
- [7] Assembleia da República, “Lei n.º 16/2013, de 8 de fevereiro,” *Diário da República n.º 28/2013, Série I*, pp. 1–2, 2013.
- [8] Ministério da Saúde, “Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de agosto, Regime jurídico dos medicamentos de uso humano. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 167/2006, Série I*, pp. 1–143, 2006.
- [9] INFARMED I.P., “Saiba mais sobre psicotrópicos e estupefacientes,” pp. 1–2, 2010, Acedido: 04 de agosto de 2021. [Online]. Disponível: [https://www.infarmed.pt/documents/15786/1228470/22\\_Psicotropicos\\_Estup eficientes.pdf](https://www.infarmed.pt/documents/15786/1228470/22_Psicotropicos_Estup eficientes.pdf).
- [10] WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology, “ATC - Structure and principles.” [https://www.whocc.no/atc/structure\\_and\\_principles/](https://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/) (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [11] Ministério da Saúde, “Despacho n.º 4742/2014, de 2 de abril,” *Diário da República n.º 65/2014, Série II*, pp. 1–10, 2014.
- [12] INFARMED I.P., “Circular Informativa N.º 019/CD/100.20.200, Projeto Via Verde do Medicamento,” pp. 1–2, 2015.
- [13] Ministério da Saúde, “Decreto-Lei n.º 97/2015, de 1 de junho, Proceda à criação do Sistema Nacional de Avaliação de Tecnologias de Saúde. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 105/2015, Série I*, pp. 1–20, 2015.
- [14] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 195-C/2015, de 30 de junho. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 125/2015, 1º Supl. Série I*, pp. 1–9, 2015.
- [15] Ordem dos Farmacêuticos, *Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos*. 1998.

- [16] INFARMED I.P., “Perguntas frequentes - Farmacovigilância.” [https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos\\_uso\\_humano/farmacovigilancia](https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano/farmacovigilancia) (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [17] World Health Organization, *The Importance of Pharmacovigilance - Safety Monitoring of medicinal products*. 2002.
- [18] INFARMED I.P., “Notificar reação.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/submissaoram> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [19] VALORMED, “Quem somos.” <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [20] VALORMED, “Processo.” <http://www.valormed.pt/paginas/8/processo> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [21] SPMS, “‘Diz não a uma seringa em segunda mão’ 1993-2012.” <https://www.spms.min-saude.pt/2013/03/diz-nao-a-uma-seringa-em-segunda-mao-1993-2012/> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [22] SPMS, “Programa de troca de seringas nas farmácias (PTS) - Fluxograma para requisição e gestão de material pela farmácia,” 2017. [http://spms.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/12/2017.07.19\\_PTS\\_Fluxograma2017.pdf](http://spms.min-saude.pt/wp-content/uploads/2017/12/2017.07.19_PTS_Fluxograma2017.pdf) (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [23] INFARMED I.P., “Normas relativas à dispensa de medicamentos e produtos de saúde,” *Ministério da Saúde*, pp. 1–42, 2018.
- [24] Gabinete do Secretário de Estado da Saúde, “Despacho n.º 2935-B/2016, de 25 de fevereiro,” *Diário da República n.º 39/2016, 1º Supl. Série II*, pp. 1–2, 2016.
- [25] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 224/2015, de 27 de julho, regime jurídico a que obedecem as regras de prescrição e dispensa de medicamentos e produtos de saúde e define as obrigações de informação a prestar aos utentes. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 144/2015, Série I*, pp. 1–12, 2015.
- [26] INFARMED I.P., “Deliberação N.º 70/CD/2012, de 24 de maio,” p. 1\*3, 2012.
- [27] INFARMED I.P., “Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde,” *Ministério da Saúde*, pp. 1–38, 2014.
- [28] Presidência do Conselho de Ministros, “Decreto-Lei n.º 26/2018, de 24 de abril,” *Diário da República n.º 80/2018, Série I*, pp. 1–6, 2018.
- [29] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 284-A/2016, de 4 de novembro,” *Diário da República n.º 212/2016, 1º Supl. Série I*, pp. 1–10, 2016.
- [30] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 195-D/2015, de 30 de junho,” *Diário da República n.º 125/2015, 1º Supl. Série I*, pp. 1–5, 2015.


- [31] Ministério da Saúde, “Despacho n.º 13020/2011, de 29 de setembro,” *Diário da República n.º 188/2011, Série II*, pp. 1–2, 2011.
- [32] Trabalho Solidariedade e Segurança Social e Saúde, “Portaria n.º 287/2016, de 10 de novembro. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 216/2016, Série I*, pp. 1–2, 2016.
- [33] Trabalho Solidariedade e Segurança Social e Saúde, “Portaria n.º 154/2018, de 28 de maio,” *Diário da República n.º 102/2018, Série I*, p. 1, 2018.
- [34] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 223/2015, de 27 de julho, Regula o procedimento de pagamento da comparticipação do Estado no preço de venda ao público (PVP) dos medicamentos dispensados a beneficiários do Serviço Nacional de Saúde (SNS). Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 144/2015, Série I*, pp. 1–6, 2015.
- [35] Ministério da Justiça, “Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de janeiro, Lei de Combate à Droga. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 18/1993, Série I-A*, pp. 1–39, 1993.
- [36] Ministério da Justiça, “Decreto Regulamentar n.º 61/94, de 12 de outubro, Revê a legislação de combate à droga. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 236/1994, Série I-B*, pp. 1–29, 1994.
- [37] INFARMED I.P., “Circular Informativa, N.º 166/CD/100.20.200, Registos de Psicotrópicos e Estupefacientes,” pp. 1–4, 2015.
- [38] Ministério da Saúde, “Despacho n.º 17690/2007, de 10 de agosto,” *Diário da República n.º 154/2007, Série II*, pp. 1–2, 2007.
- [39] INFARMED I.P., “Lista de DCI - MNSRM-EF.” [https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes\\_transferencia\\_titular\\_aim/lista\\_dci](https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes_transferencia_titular_aim/lista_dci) (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [40] Farmácias Portuguesas, “Automedicação e bom senso,” 2019. <https://www.farmaciasportuguesas.pt/menu-principal/doencas-cronicas/automedicacao-e-bom-senso.html> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [41] Ministério da Saúde, “Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de setembro,” *Diário da República n.º 185/2008, Série I*, pp. 1–80, 2008.
- [42] Ministério da Agricultura Desenvolvimento Rural e Pescas, “Decreto-Lei n.º 136/2003, de 28 de junho. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 147/2003, Série I-A 2003-06-28*, pp. 1–7, 2003.
- [43] Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, “Decreto-Lei n.º 314/2009, de 28 de outubro,” *Diário da República n.º 209/2009, Série I*, pp.

- 1–110, 2009.
- [44] Ministério da Saúde, “Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de junho, Estabelece as regras a que devem obedecer a investigação, o fabrico, a comercialização, a entrada em serviço, a vigilância e a publicidade dos dispositivos médicos e respectivos acessórios. Legislação consolidada,” *Diário da República n.º 115/2009, Série I*, pp. 1–76, 2009.
- [45] INFARMED I.P., “Perguntas Frequentes - Dispositivos médicos.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/dm> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [46] Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, “Decreto-Lei n.º 216/2008, de 11 de novembro. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 219/2008, Série I*, pp. 1–6, 2008.
- [47] Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas, “Decreto-Lei n.º 74/2010, de 21 de junho. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 118/2010, Série I*, pp. 1–5, 2010.
- [48] “Leites Infantis | Clube Bebê Nestlé.” <https://www.nestlebebe.pt/produtos-e-marcas/leites-infantis-e-de-crescimento#> (acedido a 04 de agosto de 2021).
- [49] Agricultura Florestas e Desenvolvimento Rural, “Decreto-Lei n.º 62/2017, de 9 de junho. Legislação Consolidada,” *Diário da República n.º 112/2017, Série I*, pp. 1–22, 2017.
- [50] Direção-Geral da Saúde, “Norma n.º 002/2011, de 14 de janeiro, Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus,” pp. 1–13, 2011.
- [51] Direção-Geral da Saúde, “Norma n.º 019/2011, de 28 de setembro atualizada a 11 de maio de 2017, Abordagem Terapêutica das Dislipidemias no Adulto,” pp. 1–17, 2017.
- [52] Direção-Geral da Saúde, “Norma n.º 020/2011, de 28 de setembro atualizada a 19 de março de 2013, Hipertensão Arterial: definição e classificação,” pp. 1–6, 2013.
- [53] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 594/2004, de 2 de junho,” *Diário da República n.º 129/2004, Série I-B*, pp. 1–5, 2004.
- [54] Ministérios da Economia e da Saúde, “Portaria n.º 769/2004, de 1 de julho,” *Diário da República n.º 153/2004, Série I-B*, pp. 1–2, 2004.
- [55] Ministério da Saúde, “Despacho n.º 18694/2010, de 16 de dezembro,” *Diário da República n.º 242/2010, Série II*, pp. 1–2, 2010.
- [56] Direção-Geral da Saúde, “Norma n.º 003/2020, de 16 de março atualizada a 22 de março de 2020, Infecção por SARS-CoV-2 (COVID-19) Farmácia comunitárias,” pp. 1–14, 2020.
- [57] Serviço Nacional de Saúde, “Covid-19 | Pandemia,” 2020.

- <https://www.sns.gov.pt/noticias/2020/03/11/covid-19-pandemia/> (acedido a 05 de agosto de 2021).
- [58] Associação Nacional das Farmácias, “Linha 1400.” <https://www.1400safe.pt/> (acedido a 05 de agosto de 2021).
- [59] Saúde - Gabinete da Ministra, “Despacho n.º 4270-C/2020, de 7 de abril,” *Diário da República n.º 69/2020, 3º Supl. Série II*, pp. 1–2, 2020.
- [60] Ministério da Saúde, “Portaria n.º 56/2021, de 12 de março,” *Diário da República n.º 50/2021, Série I*, pp. 1–3, 2021.
- [61] INFARMED I.P., “Autotestes destinados à deteção do antigénio do vírus SARS-CoV-2.” <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/autotestes> (acedido a 05 de agosto de 2021).
- [62] Ministério da Saúde - Serviços, “Coronavírus | COVID-19 - Registe aqui o resultado do Autoteste.” <https://servicos.min-saude.pt/covid19/Login?ReturnUrl=%2F covid19%3Fctx%3D3&ctx=10> (acedido a 05 de agosto de 2021).
- [63] Universidade da Beira Interior, “UBI promove programa de rastreios à COVID-19.” <https://www.ubi.pt/Noticia/6994> (acedido a 05 de agosto de 2021).
- [64] Abbott, “Panbio COVID-19 Ag Rapid Test Device | Ponto de atendimento.” <https://www.globalpointofcare.abbott/pt/product-details/panbio-covid-19-ag-antigen-test.html> (acedido a 05 de agosto de 2021).

## 14. Anexos

### Anexo I – Ficha de preparação e cálculo do preço de venda do medicamento manipulado: Creme de permetrina a 5% (m/m).

 **Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados**

Medicamento: Creme de Permetrina a 5% (m/m)

Por em substância(s) activa(s): 100 g (ml ou unidades) contém 5 g (ml) de permetrina

Forma farmacêutica: Creme Data de preparação: 31.5.2021

Número do lote: 03/21 Quantidade a preparar: 80g

Matérias-primas	Lote n.º	Origem	Farmacopeia	Quantidade para 100 g (ou ml, ou unidades)	Quantidade calculada	Quantidade pesada	Rubrica do Operador e data	Rubrica do Supervisor e data
Permetrina	17573/1017	Farma Quimica Sur		5	4,21	4,254	duis 31.5.21	31.5.21
Glicerina	21040012	Alvita		5	4	4,068	duis 31.5.21	31.5.21
Carval Creme Branco	A206360	Angelini Farmacêutica		90	71,79	7,325	duis 31.5.21	31.5.21
						7,142	duis 31.5.21	31.5.21
						57,819	duis 31.5.21	31.5.21

**Preparação**

Elaborada de acordo com a técnica de manipulação 40

Rubrica do Operador: duis

**Embalagem**

Tipo de embalagem: Unguator

Capacidade do recipiente: 100/140 ml

Material de embalagem	Nº do lote	Origem
<u>Unguator</u>		

Operador: duis


IMP.10.1



**gako unguator**  
# 100

The Original - Made in Germany

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*



**Ficha de Preparação de  
Medicamentos Manipulados**

---

*modo de utilização e Condições de conservação*

Condições de conservação: Operador: duis  
Conservar na embalagem à temperatura ambiente  
(13 a 25°C)

Prazo de utilização: Operador: duis  
De 31/5/2021 a 31/6/2021 (31 dias após preparação)

*Verificação*

ENSAIO	ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO	Rubrica do Operador
Características Organolépticas	Homogêneo, (cor branca)	conforme	duis
Verificação da massa	80g ± 5%	78,95g conforme	duis
pH	5 - 5,5	5 conforme	duis

Aprovado  Rejeitado

Supervisor: Dulce 31/5/21

*Nome, morada e telefone do doente*

Nome: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

*Nome do prescriptor*

\_\_\_\_\_

*Anotações*

5g permetrina — 100g manipulado    x = 4g permetrina  
 x                    — 80g manipulado

como no Boletim de análise tem 95% pureza;  
 $100\% \times 4g = 95\% \times x$      $x = 4,21g$  de permetrina

IMP.10.1

Caracterização *in vitro* da bioatividade do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*



Farmácia São Cosme

Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

Cálculo do preço de venda

**MATÉRIAS-PRIMAS:**

matérias-primas	embalagem existente em armazém		preço de aquisição de uma dada quantidade unitária (s/IVA)		quantidade a usar	factor multiplicativo	valor da matéria-prima utilizada na preparação
	quantidade adquirida	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade unitária	preço			
permetrina	100g	20,90	1	0,209	x 4,264	x 2,2	= 1,955
creme gordão	100 ml	5,58			x	x	= 5,58
glicerina	60 ml	1,07	1	0,0128	x 4,068	x 2,2	= 0,189
					x	x	=
					x	x	=
subtotal A							7,694

**HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:**

	forma farmacêutica	quantidade	F (€)	factor multiplicativo	valor
valor referente à quantidade base	Incorporação de substância activa em sistemas pré-preparados industrialmente	cte 100g	5,05	x 3	= 15,15
valor adicional			x	x	=
subtotal B					15,15

**MATERIAL DE EMBALAGEM:**

materiais de embalagem	preço de aquisição (s/IVA)	quantidade	factor multiplicativo	valor
Unguentos (100/140)	1,25	x 1	x 1,2	= 1,50
		x	x 1,2	=
subtotal C				1,50

**PREÇO DE VENDÀ AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO:**

(A + B + C) x 1,3 = 31,647

+ IVA = 1,89

D = 33,53

**DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:**

dispositivo	preço unitário	quantidade	valor

E =

**PREÇO FINAL: D + E** = 33,53

Operador: Luis Supervisor: Dulce

Rubrica do Director Técnico: [assinatura] Data: 31.5.21

## Aneco II – Rótulo do medicamento manipulado: Creme de permetrina a 5% (m/m).

**FARMÁCIA SÃO COSME**  
Dir. Técnica: Dr. Carlos Alberto Gama Tavares  
Alameda da Europa, Lote 15, Fração D e E • Tel: 275 331 463 • Fax 275 331 477 • 6200-546 COVILHÃ

N.º 03121 e 33,53  
Crema de Permetrina a 5% (m/m)  
100g de crema contém 5g de Permetrina  
Quantidade dispensada: 78,46g  
Preparado a 31.6.2021  
Prazo de utilização: 5.6.2021  
conservar ao abrigo da luz, na embalagem  
bem fechada e a temperatura ambiente.  
ótimo.

## Anexo III – Fluxograma do Procedimento da Dispensa de Medicamentos em Farmácia Comunitária cedido pelo CEDIME.

