

João Luís Sousa Janela

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Derivados do ácido cinâmico. Contribuição para a investigação dos inibidores das ciclo-oxigenases” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Ana Isabel Rebelo, da Doutora Branca Silva e da Professora Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

João Luís Sousa Janela

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Derivados do ácido cinâmico. Contribuição para a investigação dos inibidores das ciclo-oxigenases” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Ana Isabel Rebelo, da Doutora Branca Silva e da Professora Doutora Fernanda Maria Fernandes Roleira, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Declaração de autoria

Eu, João Luís Sousa Janela, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2013136435, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Derivados do ácido cinâmico. Contribuição para a investigação dos inibidores das ciclo-oxigenases” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 7 de setembro de 2018.



(João Luís Sousa Janela)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã, sem os quais eu não estaria prestes a concluir esta etapa, pelo apoio incondicional em todos os meus projetos, por estarem sempre presentes nos meus melhores e piores momentos e por sempre acreditarem em mim e nas minhas capacidades – sobretudo nas ocasiões em que eu deixo de acreditar.

À Professora Doutora Fernanda Roleira, pela disponibilidade evidenciada enquanto orientadora, pelo auxílio no planeamento e revisão da presente monografia, e ainda – juntamente com o Professor Doutor Elisiário Tavares da Silva e a Professora Doutora Carla Varela – pela orientação na execução do trabalho laboratorial que deu origem ao tema abordado.

A todos os colaboradores da Farmácia Estádio – Dra. Ana, André, Edite, Dina, Luís, Mónica, Hugo, Maria João, Carolina e D. Glória –, pela simpatia e disponibilidade constantes, por me terem proporcionado um estágio que superou largamente as minhas expectativas e pelo exemplo de competência que sempre me transmitiram.

A todos os colaboradores da Bluepharma com quem tive o privilégio de contactar – Branca, António, Doutora Cláudia, Luís, Tânia, Ana Sofia, Joanas, Mariana, Maria, Francisca, Sara, Rute, Marisa e tantos outros, do Departamento de Investigação e Inovação e não só – pelo acolhimento e pelo auxílio na resolução das dificuldades com que me deparei no decurso do estágio.

Aos amigos que eram desconhecidos quando esta aventura começou, sem os quais este percurso não teria sido tão marcante como foi, pelo espírito de entreatajuda, por todos os momentos que partilhámos, por todas as memórias e pela esperança de que a distância e o tempo não nos separem.

Àqueles que foram mais do que uma simples “família de praxe” – o meu padrinho, as minhas madrinhas e, chamemos-lhes assim, as minhas pseudo-madrinhas – pela amizade sincera, por me terem feito redescobrir Coimbra, por todos os conselhos e por terem estado sempre presentes, mesmo após terem deixado esta Casa.

Aos amigos que já o eram há cinco anos atrás, por terem estado sempre do meu lado, mesmo quando a distância ou as circunstâncias impediam o nosso encontro, e por termos partilhado tantos momentos marcantes do nosso percurso académico.

ÍNDICE

Resumo	7
Palavras-chave.....	7
Abstract	8
Keywords.....	8
Monografia – “Derivados do ácido cinâmico. Contribuição para a investigação dos inibidores das ciclo-oxigenases”	
Abreviaturas.....	10
1. Considerações gerais sobre ciclo-oxigenases.....	12
1.1. Estrutura.....	12
1.2. Função catalítica.....	13
1.3. Isoformas da ciclo-oxigenase	14
1.4. Ciclo-oxigenase e processos homeostáticos	15
1.5. Ciclo-oxigenase e processos fisiopatológicos: inflamação.....	16
2. Fármacos inibidores das ciclo-oxigenases.....	17
2.1. Anti-inflamatórios não esteroides de primeira geração	18
2.2. Inibidores seletivos da ciclo-oxigenase-2: coxibs	19
2.3. Mecanismos de inibição das ciclo-oxigenases	20
2.3.1. Inibição irreversível	21
2.3.2. Inibição reversível.....	22
3. Derivados de ácidos cinâmicos como moléculas com atividade farmacológica.....	22
3.1. Hexilamidas de ácidos cinâmicos com atividade antioxidante	23
3.2. Hexilamidas de ácidos cinâmicos com atividade antitumoral.....	23
3.3. Ésteres de ácidos cinâmicos com atividade inibitória das ciclo-oxigenases	24
4. Síntese, purificação e caracterização de hexilamidas de ácidos cinâmicos com potencial atividade inibitória das ciclo-oxigenases	24
4.1. Fundamentação teórica.....	24
4.1.1. Seleção dos compostos a sintetizar.....	24
4.1.2. Métodos de síntese e mecanismos reacionais	27
4.2. Materiais, equipamentos e reagentes.....	30
4.3. Procedimento geral para a síntese, purificação e caracterização das hexilamidas dos ácidos 3,4-dimetoxicinâmico, 3-hidroxi-4-metoxicinâmico e 3,4-(metilendioxo)cinâmico	30
4.3.1. <i>N</i> -hexil-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenamida.....	31
4.3.2. <i>N</i> -hexil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-propenamida.....	31
4.3.3. <i>N</i> -hexil-3-(3,4-(metilendioxo)fenil)-2-propenamida.....	32

4.4. Procedimento para a obtenção e purificação dos compostos precursores do <i>N,N'</i> -di(3,4-(metilenodioxo)cinamoil)-1,6-diamino-hexano.....	33
4.4.1. <i>N</i> -(3-(3,4-(metilenodioxo)fenil)-2-propenoil)- <i>N'</i> - <i>tert</i> -butiloxicarbonil-1,6-diamino-hexano	33
4.4.2. <i>N</i> -(3-(3,4-(metilenodioxo)fenil)-2-propenoil)-1,6-diamino-hexano	33
5. Estudo da atividade inibitória dos compostos sintetizados sobre as ciclo-oxigenases.....	34
5.1. Fundamento teórico e resumo do método.....	34
5.2. Resultados e discussão	34
6. Conclusões	36
Bibliografia	38
Anexos	42

Relatório de estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas.....	51
1. Introdução.....	52
2. Análise SWOT	52
2.1. Pontos Fortes	52
2.1.1. Localização da farmácia	52
2.1.2. Perfil demográfico dos utentes	53
2.1.3. Instalações	53
2.1.4. Sifarma 2000®	54
2.1.5. Aprendizagem das tarefas a desempenhar	54
2.1.6. Realização prévia de um estágio de verão	54
2.1.7. Rastreios.....	55
2.1.8. Integração na equipa e autonomia.....	55
2.1.9. Variedade dos conhecimentos aplicados no aconselhamento.....	56
2.1.10. Evolução do desempenho.....	57
2.2. Pontos Fracos.....	57
2.2.1. Sinais de inexperiência no atendimento	57
2.2.2. Adaptação da comunicação ao utente.....	58
2.2.3. Nomes comerciais de medicamentos	58
2.2.4. Nível de preparação em algumas áreas de aconselhamento	58
2.2.5. Conhecimentos limitados em algumas áreas de farmacoterapia	59
2.3. Oportunidades	60
2.3.1. Participação em formações	60
2.3.2. Contacto com profissionais da área da saúde.....	60
2.3.3. Serviço de revisão da medicação	60

2.4. Ameaças.....	61
2.4.1. Desconfiança face ao aconselhamento do estagiário.....	61
2.4.2. Concorrência dos estabelecimentos de venda de MNSRMs.....	61
2.4.3. Desvalorização dos conhecimentos do farmacêutico	62
2.4.4. Problemas informáticos.....	62
3. Casos Clínicos.....	62
3.1. Caso 1 – Constipações	62
3.2. Caso 2 – Dermatofitose	63
3.3. Caso 3 – Hipertensão arterial	63
4. Conclusão	64
Bibliografia	65
Anexo	67

Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas.....	69
1. Introdução.....	70
2. Projeto de estágio – Desenvolvimento e validação de um método para a determinação do tamanho de partícula de lipossomas.....	70
2.1. Noções básicas sobre lipossomas.....	70
2.2. Relevância da determinação do tamanho de partícula em formulações lipossomais....	71
2.3. Fundamento teórico da medição do tamanho de partícula por DLS/PCS	72
2.4. Resumo do trabalho realizado.....	72
3. Análise SWOT	73
3.1. Pontos Fortes	73
3.1.1. Acolhimento e integração na empresa	73
3.1.2. Condições de trabalho	74
3.1.3. Reuniões periódicas	75
3.1.4. Capacidade de pesquisa e espírito crítico.....	75
3.1.5. Apresentação do trabalho desenvolvido.....	75
3.1.6. Relevância do trabalho desenvolvido	75
3.1.7. Domínio da língua inglesa	76
3.1.8. Evolução do desempenho.....	76
3.2. Pontos Fracos.....	76
3.2.1. Falta de conhecimentos específicos.....	76
3.2.2. Assimilação de regras estritas no trabalho laboratorial.....	77
3.2.3. Registo de fontes de informação	77
3.2.4. Capacidade de síntese de informação.....	77

3.3. Oportunidades	78
3.3.1. Seleção dos estagiários por entrevista.....	78
3.3.2. Contacto com a indústria farmacêutica.....	78
3.3.3. Ferramentas e competências de trabalho em investigação.....	78
3.3.4. Acompanhamento do trabalho laboratorial	79
3.4. Ameaças.....	79
3.4.1. Escassez de <i>guidelines</i> sobre formulações lipossomais	79
3.4.2. Implicações da duração do estágio	80
4. Conclusão	80
Bibliografia	81
Anexos	82

RESUMO

O papel da ciclo-oxigenase (COX) em eventos como inflamação, dor e febre já é conhecido há muito tempo: esta enzima catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandina G_2 seguida da H_2 , sendo que esta última serve como substrato para a formação de outras prostaglandinas, e ainda de prostaciclina (PGI_2) e tromboxano A_2 (TxA_2 , estimulador da ativação e agregação plaquetar). Os fármacos inibidores da COX, designados anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), têm uma longa tradição de utilização no tratamento dos sintomas inicialmente referidos. O conhecimento a este nível sofreu uma atualização muito significativa quando foi descoberta uma segunda isoforma da COX (COX-2). Atualmente, considera-se que a COX-1 é expressa de modo constitutivo, sendo importante para a homeostase e para o funcionamento fisiológico normal das células e tecidos onde se encontra, enquanto a COX-2 é maioritariamente expressa de modo induzido, tendo um papel decisivo em episódios inflamatórios. Estas descobertas levaram ao desenvolvimento de novos fármacos que inibem especificamente a COX-2 – os coxibs.

Na sequência de vários estudos que revelaram propriedades antioxidantes e antitumorais de derivados de ácidos cinâmicos, foram sintetizadas hexilamidas de diferentes ácidos cinâmicos e as suas atividades inibitórias sobre a COX-1 e a COX-2 foram avaliadas. A presente monografia pretende apresentar as metodologias de síntese de três destas hexilamidas (e ainda de outras hexilamidas, mais complexas, cuja atividade inibitória das COX poderá ser avaliada futuramente), bem como os resultados dos respetivos estudos da atividade inibitória das COX.

Para além da monografia, este documento inclui dois relatórios que descrevem estágios curriculares realizados nas áreas de farmácia comunitária e indústria farmacêutica.

PALAVRAS-CHAVE

Ciclo-oxigenase; ácido cinâmico; hexilamida; síntese; inibidor; anti-inflamatório; farmácia comunitária; indústria farmacêutica.

ABSTRACT

The role of cyclooxygenase (COX) in inflammation, pain and fever has long been established: this enzyme catalyzes the conversion of arachidonic acid into prostaglandins G₂ and then H₂, with the latter being the substrate for the formation of other prostaglandins, as well as prostacyclin (PGI₂) and thromboxane A₂ (TxA₂, stimulator of platelet activation and aggregation). COX inhibitors known as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have long been used to treat the previously mentioned symptoms. Knowledge on this field was significantly upgraded when a second isoform of COX was discovered (COX-2). It is now accepted that COX-1 is mostly constitutively-expressed, assuring homeostasis and normal physiological function of the cells and tissues where it is found, while COX-2 is for the most part inducible-expressed, with a decisive role in inflammatory responses. Such findings led to the development of new drugs which specifically inhibit COX-2 – the coxibs.

Following a number of studies with cinnamic acid derivatives, which revealed antioxidant and antitumoral activities, hexylamides of different cinnamic acids were synthesized and their inhibitory activity on COX-1 and COX-2 was assessed. The current monograph aims to present the synthesis methodologies for three of those hexylamides (as well as for more complex hexylamides which could be assessed for their COX-inhibiting activity in the future), along with the results of their COX-inhibiting activity studies.

In addition to the monograph, this document contains two reports describing curricular internships in the fields of community pharmacy and pharmaceutical industry.

KEYWORDS

Cyclooxygenase; cinnamic acid; hexylamide; synthesis; inhibitor; anti-inflammatory; community pharmacy; pharmaceutical industry.

Monografia

Derivados do ácido cinâmico.

Contribuição para a investigação dos inibidores das ciclo-oxigenases

ABREVIATURAS

AA	ácido araquidónico
AAS	ácido acetilsalicílico
AINE	anti-inflamatório não esteroide
Ala	alanina
Arg	arginina
Asn	asparagina
AVC	acidente vascular cerebral
BOC	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
-BOC-	- <i>tert</i> -butiloxicarbonil-
BOP	hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfónio
bs	singuleto <i>broad</i>
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
COX	ciclo-oxigenase
COX-1	ciclo-oxigenase-1
COX-2	ciclo-oxigenase-2
d	duplete
dd	duplo duplete
DMF	dimetilformamida
DMSO- <i>d</i> ₆	dimetilsulfóxido deuterado
E _{allo}	monómero alostérico
E _{cat}	monómero catalítico
HCl	ácido clorídrico
HMPA	hexametilfosforamida
IL-1	interleucina-1
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
Ile	isoleucina
IV	infravermelho
<i>J</i>	constante de acoplamento
Leu	leucina
log P	logaritmo do coeficiente de partilha octanol-água
LPS	lipopolissacarídeo

m	multiplete
MgSO ₄	sulfato de magnésio
NaHCO ₃	hidrogenocarbonato de sódio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
O ₂	oxigénio (molecular)
Pf	intervalo de fusão
PG	prostaglandina
PGD ₂	prostaglandina D ₂
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	prostaglandina F _{2α}
PGG ₂	prostaglandina G ₂
PGH ₂	prostaglandina H ₂
PGHS	prostaglandina endoperóxido sintetase
PGI ₂	prostaciclina
PLA ₂	fosfolipase A ₂
ppm	partes por milhão
RCV	risco cardiovascular
RMN	ressonância magnética nuclear
RNA	ácido ribonucleico
ROS	espécies reativas de oxigénio (<i>reactive oxygen species</i>)
s	singuleto
Ser	serina
t	triplete
TEA	triethylamina
TLC	cromatografia em camada fina (<i>thin-layer chromatography</i>)
TNF-α	fator de necrose tumoral α
TxA ₂	tromboxano A ₂
TXBSI	inibidor da tromboxano sintetase
Tyr	tirosina
Val	valina

I. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CICLO-OXIGENASES

As ciclo-oxigenases (COX), também designadas prostaglandina endoperóxido sintetases (PGHS),¹ são enzimas que catalisam reações determinantes na produção de prostanoides (prostaglandinas, prostaciclina e tromboxano),² moléculas envolvidas numa grande variedade de processos fisiológicos e patológicos,³ incluindo inflamação, dor e febre.⁴ As COX constituem o alvo terapêutico dos fármacos designados por anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), sendo inibidas por estes.⁵ A descoberta deste mecanismo de ação geral só se concretizou na década de 1970,⁵ tendo passado pela elucidação parcial do mecanismo da síntese enzimática das prostaglandinas a partir dos co-substratos ácido araquidónico (AA) e oxigénio (O₂),³ bem como pela descoberta de que os AINEs inibiam a formação de prostaglandinas.⁶ Nessa mesma década, procedeu-se ao isolamento da COX para aprofundar o estudo da sua estrutura e função.³ Só mais tarde se veio a descobrir que existia uma segunda isoforma de COX, expressa em circunstâncias diferentes daquela que até então era conhecida, passando a fazer-se a distinção entre a ciclo-oxigenase-1 (COX-1) e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2).⁴

I.1. Estrutura

As COX são enzimas homodiméricas,⁴ isto é, constituídas por duas cadeias polipeptídicas iguais. Cada uma destas duas subunidades contém três domínios distintos: um domínio fator de crescimento epidérmico (com cerca de 50 aminoácidos), um domínio de ligação a membrana (resíduos de aminoácido 72 a 116),¹ que determina a localização intracelular das COX no lado interno da membrana do retículo endoplasmático⁷ e nas membranas nucleares interna e externa,⁸ e um domínio catalítico (com cerca de 460 aminoácidos), que inclui centros ativos ciclo-oxigenase e peroxidase em lados opostos de um grupo heme⁴ (protoporfirina IX férrica).⁹ (Anexo I)

O centro ativo ciclo-oxigenase é acessível por um canal que inicia junto ao domínio de ligação à membrana e que apresenta uma constrição,⁹ para lá da qual passa a ser revestido por aminoácidos hidrofóbicos, terminando num compartimento estreito.⁴ Estas características determinam que a molécula de AA, ao chegar ao centro ativo, fique na posição ideal em relação ao aminoácido 385, um resíduo de tirosina (Tyr-385), o qual é o principal responsável pela catálise enzimática.⁴

Por sua vez, o acesso ao centro ativo peroxidase é feito no lado contrário ao domínio de ligação à membrana,⁹ através de uma fenda pouco profunda parcialmente coberta

por aminoácidos hidrofóbicos.⁴ esta estrutura determina que os substratos preferenciais da peroxidase sejam peróxidos lipofílicos primários e secundários.¹⁰

Para além do grupo heme, as COX contêm outros grupos prostéticos, nomeadamente oligossacarídeos ligados a resíduos de asparagina (Asn). Um destes, ligado à Asn-410, parece ter um papel determinante na definição da estrutura tridimensional da cadeia polipeptídica.¹

1.2. Função catalítica

O AA, um ácido gordo tetra-insaturado com 20 átomos de carbono, está presente nas células em fosfolípidos membranares, na sua forma esterificada. Por ação de uma fosfolipase, geralmente a fosfolipase A₂ (PLA₂), a ligação éster é hidrolisada e o AA fica disponível para atuar como substrato das COX.¹ Estas catalisam duas reações sequenciais: a bis-dioxigenação do AA, convertendo-o em prostaglandina G₂ (PGG₂), o que ocorre no centro ativo ciclo-oxigenase (Anexo 2); e a redução da PGG₂ no centro ativo peroxidase, resultando em prostaglandina H₂ (PGH₂)⁴ (Anexo 3).

Contudo, ainda antes da primeira reação, a COX tem de ser ativada, o que acontece graças à peroxidase: esta usa um peróxido como substrato, o qual é reduzido ao álcool correspondente, para oxidar o heme férrico (Fe^{III}) da COX, convertendo-o num radical catiónico oxo-ferrilporfirínico (Fe^{IV}).⁴ Este capta um eletrão da Tyr-385, a qual é oxidada a radical tirosilo, e converte-se em oxo-ferrilporfirina (Fe^{IV}).⁴

A molécula de AA insere-se no canal do centro ativo ciclo-oxigenase de tal modo que o seu grupo carboxilo fique na constrição do mesmo, estabelecendo interações com os resíduos de aminoácidos Arg-120 (por ligação iónica) e Tyr-355 (por ligação de hidrogénio), e que o seu carbono terminal fique na porção final mais estreita.¹¹ Esta conformação específica faz com que o carbono 13 do AA esteja próximo do radical tirosilo.¹¹ Este radical vai ser reduzido pelo AA: um dos átomos de hidrogénio ligados ao carbono 13 (pro-S) vai ser captado pelo radical tirosilo, regenerando o resíduo de tirosina,⁴ enquanto a molécula de AA fica com um eletrão desemparelhado no carbono 11.¹² Para repor o emparelhamento neste átomo, dá-se a ligação de uma molécula de O₂ ao carbono 11, resultando num peróxido radicalar em que o átomo de oxigénio terminal recém-incorporado tem um eletrão desemparelhado. Em seguida, este átomo liga-se ao carbono 9, concluindo a formação da função endoperóxido, e é o carbono 8 que passa a ter um eletrão desemparelhado.^{9,12} Este eletrão vai assegurar uma nova ligação covalente simples entre o carbono 8 e o carbono 12, introduzindo uma segunda ciclização na molécula, sendo agora o

carbono 14 que fica com um elétron desemparelhado. Este átomo liga-se a uma segunda molécula de O₂, originando um novo peróxido radicalar,¹² o qual vai ser reduzido ao receber um elétron da Tyr-385.⁴ Deste modo, o radical tirosilo é regenerado e obtém-se o produto da reação de conversão do AA: a PGG₂, molécula com duas funções peróxido. O facto de o radical tirosilo ser regenerado significa que a COX não precisa de ser novamente ativada para catalisar mais reações de bis-dioxigenação.⁴

A conversão da PGG₂ em PGH₂ é assegurada pela peroxidase, que reduz o grupo 15-hidroperóxido ao respetivo grupo hidroxilo, pelo mesmo mecanismo descrito para a ativação da COX.⁴ Para que esta reação possa ocorrer, o grupo heme deve estar na forma férrica (Fe^{III}). Esta pode ser regenerada pela redução da oxo-ferrilporfirina (Fe^{IV}) por uma espécie que possa ceder um elétron, tal como o radical catiónico oxo-ferrilporfirínico (Fe^{IV}) também pode ser reduzido a oxo-ferrilporfirina (Fe^{IV}).⁴

A partir da PGH₂, são produzidas por catálise enzimática prostaglandina D₂ (PGD₂), prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prostaciclina (PGI₂) e tromboxano A₂ (TxA₂).¹ A generalidade das células do organismo humano possui enzimas catalisadoras da síntese de prostaglandinas (PGs), sendo os eritrócitos a única exceção.¹³ Os efeitos das PG nas respetivas células-alvo são desencadeados pela sua ligação a recetores acoplados a proteínas G.⁴

1.3. Isoformas da ciclo-oxigenase

A Tabela I mostra algumas das principais diferenças entre a COX-1 e a COX-2. Estas isoformas têm estruturas tridimensionais muito semelhantes e as suas sequências de aminoácidos apresentam 60% de homologia.⁴ A composição em aminoácidos do centro ativo peroxidase apresenta várias diferenças entre as duas isoformas, mas o impacto das mesmas na catálise parece ser pouco significativo. Por sua vez, a região do centro ativo ciclo-oxigenase onde se dá a catálise apresenta um único aminoácido distinto entre as duas isoformas, na posição 523.¹⁰ Esta diferença é determinante para a seletividade característica de alguns inibidores da COX: devido ao maior tamanho do resíduo de Ile-523, certas moléculas que conseguem inibir a COX-2 estabelecem uma interação repulsiva com esse aminoácido da COX-1, o que reduz a sua capacidade de inibir esta isoforma.¹³

Tabela 1: Diferenças estruturais e de expressão entre COX-1 e COX-2.

		COX-1	COX-2
ESTRUTURA	Número de aminoácidos ¹	576	587
	Aminoácido 523 ¹⁰	Isoleucina (Ile-523)	Valina (Val-523)
	Composição glucídica ¹	3 oligossacarídeos ricos em manose	1 oligossacarídeo adicional comparativamente à COX-1
EXPRESSION	Gene codificante ⁴	<i>Ptgs-1</i>	<i>Ptgs-2</i>
	Cromossoma ¹	9	1
	Modo de expressão ⁴	Geralmente constitutiva	Geralmente induzida por estímulos inflamatórios e proliferativos
	RNA mensageiro ⁴	Cerca de 2800 bases Estável	Cerca de 4000 bases Degradação rápida

Quanto à expressão das COX, é atualmente tido como princípio que a COX-1 está sobretudo associada à produção de prostanoídes com funções homeostáticas nos tecidos em que atuam, enquanto a COX-2 é a principal produtora de prostanoídes associados a respostas fisiopatológicas, nomeadamente inflamação, sendo a sua expressão induzida por estímulos como citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e endotoxinas. Porém, este não é um princípio absoluto.^{4,5}

Em termos de distribuição, a COX-1 está presente em praticamente todo o organismo: exemplos de células, tecidos e órgãos onde ela é expressa de forma constitutiva e assume importantes funções homeostáticas incluem as plaquetas, as células endoteliais, a mucosa gástrica e os rins. Já a COX-2 é produzida em abundância, após indução, por células como macrófagos, sinoviócitos e fibroblastos.⁵ A COX-2 também é produzida de forma constitutiva, sem ocorrer inflamação, em órgãos e tecidos como os rins, a mucosa gástrica e o cérebro.¹⁴

1.4. Ciclo-oxigenase e processos homeostáticos

A Tabela 2 ilustra várias das funções homeostáticas dos prostanoídes. Como já referido no subcapítulo anterior, a maioria destas ações está dependente da COX-1. Porém, a título de exemplo, as funções dos prostanoídes a nível gástrico parecem depender não só da COX-1, mas também da COX-2.¹⁵ Também a produção de PGI₂ no endotélio depende consideravelmente da COX-2,¹⁶ o que mostra que esta isoforma não está relacionada apenas com processos fisiopatológicos.

Tabela 2: Exemplos de funções homeostáticas dos prostanoídes.¹⁷

	Local de síntese	Função
PGE₂	Mucosa gastrointestinal	Aumento da secreção de muco e bicarbonato pela mucosa gástrica ¹⁵ Diminuição da secreção ácida no estômago ¹⁵ Regulação da contração do músculo liso do tubo digestivo Estimulação da libertação de água e eletrólitos no jejuno
	Rins (medula)	Excreção de água e sais (aumento do fluxo sanguíneo renal e diminuição da reabsorção de água, sódio e ureia)
	Útero	Estimulação das contrações musculares que ocorrem no trabalho de parto e na menstruação
PGF_{2α}		
PGI₂	Endotélio	Vasodilatação (relaxamento do músculo liso vascular) Inibição da agregação plaquetar
TxA₂	Plaquetas	Vasoconstrição (contração do músculo liso vascular) Ativação e estimulação da agregação plaquetar

1.5. Ciclo-oxigenase e processos fisiopatológicos: inflamação

A inflamação é um mecanismo fisiológico de defesa desencadeado pelo organismo perante agentes agressores de natureza infecciosa, química ou física,⁵ com o objetivo de os anular e de repor a estrutura e função homeostática dos tecidos afetados.¹⁸ De modo geral, a resposta inflamatória inclui os seguintes fenómenos: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local, aumento da permeabilidade vascular, concentração local e saída de leucócitos dos vasos sanguíneos e, no caso de ser prolongada, degenerescência e fibrose dos tecidos.^{5,18} As PGs estão envolvidas no desenvolvimento de processos inflamatórios, ocasiões em que a sua síntese é estimulada.¹⁸ A COX-2 é a principal responsável pela produção de PGs no decurso destes fenómenos, mas verifica-se que aquelas também são produzidas em células que expressam a COX-1 de modo constitutivo; esta isoforma pode ainda ser induzida em determinadas situações, como nas respostas inflamatórias desencadeadas por lipopolissacarídeo (LPS).¹⁹

Agentes agressores podem ser reconhecidos por células como macrófagos, mastócitos e células dendríticas, que ficam ativadas e libertam citocinas como TNF- α (fator de necrose tumoral α), IL-1 (interleucina-1) e IL-6 (interleucina-6).²⁰ Estes mediadores químicos são pró-inflamatórios, uma vez que recrutam mais leucócitos para o local da agressão e atuam nas células endoteliais, fazendo aumentar a permeabilidade vascular²⁰ e induzindo nelas a expressão de interleucina-8 (IL-8) e proteínas de adesão. Estas condições permitem que os leucócitos contactem com o endotélio e saiam para o exterior do vaso

sanguíneo, alcançando o local afetado e tentando eliminar o agente agressor.²⁰ A acumulação de fluido e células no tecido extravascular constitui um edema. As principais células que se deslocam do modo descrito são os neutrófilos e os monócitos, que se diferenciam em macrófagos.²⁰ As citocinas pró-inflamatórias também ativam e induzem a proliferação de fibroblastos, de modo a reparar lesões tecidulares resultantes da agressão²⁰ e, em condições normais, uma vez eliminado o agente agressor, o processo inflamatório termina com a regeneração da funcionalidade dos tecidos afetados. Porém, uma resposta inflamatória que perdure por muito tempo pode causar dano tecidual prolongado, convertendo-se numa patologia – uma inflamação crônica.²⁰

As citocinas pró-inflamatórias produzidas pelas células que reconhecem os agentes agressores induzem a expressão da COX-2 em várias células,²⁰ resultando na produção de diversos tipos de prostanoídeos. A PGE₂, produzida em macrófagos e monócitos,¹⁷ induz vasodilatação e aumenta a permeabilidade vascular, contribuindo para a formação de edema. Também regula a expressão de citocinas pelas células dendríticas e parece estimular a libertação de citocinas pró-inflamatórias.¹⁸ A PGI₂ é produzida nas células endoteliais, dependendo da COX-1 e da COX-2, e atua no músculo liso vascular, sendo vasodilatadora.¹⁸ A PGD₂ é produzida por mastócitos e basófilos¹⁷ e, para além de recrutar leucócitos, também causa vasodilatação.²¹ Ou seja, estas PGs contribuem para o aumento da permeabilidade vascular e para o processo inflamatório.¹⁷

As PGE₂¹⁸ e PGF_{2α}⁵ produzidas na sequência da indução da COX aumentam a sensibilidade das terminações nervosas sensoriais a certos mediadores químicos, como bradicinina, citocinas e histamina,¹⁷ promovendo a perceção da dor e diminuindo o respetivo limiar (hiperalgesia).¹⁸ Neste âmbito, também atuam no sistema nervoso central.²²

Por sua vez, a indução da COX pelas citocinas pró-inflamatórias leva à produção de PGE₂ no hipotálamo, a qual altera a função termorreguladora deste, levando ao aumento da temperatura corporal.⁵

Deste modo, inflamação, dor e febre são três das principais manifestações fisiopatológicas da indução das COX, nomeadamente da COX-2.

2. FÁRMACOS INIBIDORES DAS CICLO-OXIGENASES

Os AINEs são fármacos que inibem diretamente as COX. Como tal, bloqueiam a produção de PGH₂ e dos prostanoídeos dele derivados, pelo que diminuem a inflamação, dor e febre por eles induzidos.⁵ Assim, estes fármacos têm principalmente ação antipirética, analgésica e anti-inflamatória, por ordem crescente de dose.²³

2.1. Anti-inflamatórios não esteroides de primeira geração

De modo geral, estes AINEs foram introduzidos no mercado quando ainda não era conhecida a existência de diferentes isoformas da COX, pelo que não houve na sua descoberta ou desenvolvimento uma preocupação com a sua seletividade para qualquer das isoformas. Estes AINEs inibem a COX-1 e a COX-2, mas cada um tem seletividade variável para uma das isoformas, sendo que a maioria inibe preferencialmente a COX-1.²

Têm como principais indicações o tratamento sintomático de patologias caracterizadas por dor e inflamação, como é o caso das doenças reumáticas e afeções musculoesqueléticas,²³ e ainda da dismenorreia. Também são eficazes no tratamento de artralguas, mialgias, odontalgias e cefaleias,²⁴ e tendem a ser frequentemente utilizados apenas pelos seus efeitos antipirético e analgésico; porém, neste caso, é aconselhável optar por um fármaco que não tenha efeito anti-inflamatório, como o paracetamol.²³

Os AINEs podem ser classificados quanto à sua estrutura química. Exemplos destes fármacos e da respetiva classificação incluem ácidos carboxílicos como o ácido acetilsalicílico (derivado salicílico), o diclofenac (derivado heteroarilacético), a indometacina (derivado indólico), o ibuprofeno, o naproxeno (derivados propiónicos) e o ácido mefenâmico (derivado fenâmico ou antranílico).^{5,23} (Anexo 4)

O ácido acetilsalicílico (AAS) tem uma indicação terapêutica adicional que o distingue dos restantes AINEs: a inibição da agregação plaquetar, que se traduz num efeito anti-trombótico importante na prevenção da reincidência do enfarte do miocárdio ou de acidente vascular cerebral (AVC) isquémico.^{23,24} Em teoria, qualquer AINE poderia ser usado como anti-agregante plaquetar, uma vez que a inibição da COX nas plaquetas diminui a produção de TxA_2 – como já foi referido no subcapítulo 1.4, este prostanoide induz agregação plaquetar e vasoconstrição. Porém, como vai ser explicado no subcapítulo 2.3.1., o bloqueio da produção de TxA_2 pelo AAS é mais prolongado. No âmbito desta indicação terapêutica, a dose administrada de AAS é baixa (geralmente 100 a 150 mg/dia), de modo a não inibir a produção de PGI_2 , que atua como anti-agregante plaquetar.²³

Os AINEs de primeira geração apresentam vários efeitos adversos característicos que se devem em grande parte à inibição da COX-1²⁴ – mas sem descurar a COX-2 – e que são perceptíveis se forem tidas em conta as funções homeostáticas desempenhadas pelas PGs (vide subcapítulo 1.4). Um dos mais relevantes é o desenvolvimento de úlcera, irritação ou hemorragia gastroduodenal. A mucosa gástrica produz PGs que estimulam a libertação de bicarbonato e de muco e inibem a secreção ácida; por inibição deste mecanismo protetor, a mucosa fica sujeita a agressões.²⁴ Outro efeito relevante é a nefrotoxicidade, que

normalmente se traduz em agravamento de insuficiência renal pré-existente e será devida à inibição da produção de PGE₂ e PGI₂, as quais regulam o fluxo sanguíneo nos vasos renais.²⁴ É também nos rins que pode estar a explicação para outro efeito adverso: o aumento da pressão arterial. Uma explicação proposta para esta alteração é o facto de as PGs no rim regularem a libertação de renina, a qual é aumentada numa terapia com AINEs.²⁴

Uma contraindicação dos AINEs de primeira geração é a asma, o que se prende com outro efeito adverso: broncoconstrição.²⁴ Este fenómeno será devido à inibição das COX, uma vez que o AA fica disponível para ser metabolizado por outro tipo de enzimas – as lipoxigenases – que o convertem em compostos que vão dar origem a leucotrienos. Pelo menos dois destes – os leucotrienos C₄ e D₄ – causam broncoconstrição.²⁵ Outra contraindicação relevante é o seu uso na gravidez,²³ sendo de destacar o final da gestação: a inibição das COX no útero diminui a produção de PGE₂ e PGF₂α, as quais contribuem para desencadear o trabalho de parto (*vide* subcapítulo 1.4).

2.2. Inibidores seletivos da ciclo-oxigenase-2: coxibs

A descoberta de que a COX-2, e não a COX-1, era a principal responsável pela produção de PGs em estados patológicos (nomeadamente inflamação) levou ao desenvolvimento de fármacos inibidores seletivos da COX-2, para diminuir a incidência de efeitos secundários dos AINEs, sobretudo ao nível gástrico: assim apareceram os coxibs.⁴ Exemplos destes fármacos atualmente em utilização incluem o celecoxib e o etoricoxib (Anexo 4) e a sua indicação terapêutica principal é o tratamento sintomático da dor e inflamação em doenças articulares como a artrite reumatoide e a osteoartrite.^{23,24}

Pelo menos em parte, este grupo de fármacos conseguiu cumprir o seu objetivo de reduzir a incidência de efeitos adversos face aos AINEs de primeira geração. Em comparação, os coxibs apresentam uma menor incidência de efeitos adversos gastrointestinais (embora não anulem esse risco) e não provocam broncoespasmo.²⁴

Porém, foi associado aos coxibs um aumento do risco cardiovascular (RCV), que fez com que alguns deles tenham sido retirados do mercado.²⁴ De facto, foi imputado a estes fármacos um aumento da incidência de enfartes, AVCs, insuficiência cardíaca e hipertensão, sobretudo em doentes que já apresentavam algum nível prévio de RCV.²⁶ Estas observações serão provavelmente explicadas pelas alterações na produção de prostanoídes provocadas pelos coxibs. A PGI₂, com efeito vasodilatador e anti-agregante plaquetar, é produzida nas células endoteliais e deriva maioritariamente da COX-2.¹⁶ Por outro lado, o TxA₂, que é vasoconstritor e promove a agregação plaquetar, é produzido nas plaquetas e deriva

sobretudo da COX-1.¹⁶ Em condições homeostáticas, há um equilíbrio entre as ações destes prostanoídes, mas os coxibs, ao inibirem muito seletivamente a COX-2, vão diminuir a produção de PGI₂,¹⁶ havendo também evidências da diminuição da produção de óxido nítrico, que também atua como vasodilatador.²⁷ Nestas condições, os efeitos do TxA₂ podem exacerbar e promover o desenvolvimento de hipertensão e trombose.¹⁶ Considera-se que o agravamento do RCV imputável a um coxib se correlaciona com a sua seletividade para a COX-2.²⁸

Atualmente, este risco já não é restringido apenas aos coxibs, mas também a AINEs de primeira geração que exibem maior seletividade de inibição para a COX-2 do que para a COX-1, como é o caso do diclofenac.¹⁶

2.3. Mecanismos de inibição das ciclo-oxigenases

O estudo da inibição das COX deparou-se nos últimos anos com um novo paradigma: a COX-2, e possivelmente também a COX-1, é homodimérica do ponto de vista estrutural, mas não do ponto de vista funcional. Verificou-se que só um dos dois monómeros da COX-2 é que efetivamente realiza catálise, constituindo o monómero catalítico (E_{cat}). O segundo monómero regula a atividade do E_{cat} , constituindo o monómero alostérico (E_{allo}). Dependendo do composto que se ligar ao centro ativo do E_{allo} , o E_{cat} vai ser inibido ou induzido.¹

Os inibidores das COX podem atuar segundo um mecanismo dependente ou independente do tempo. O primeiro caracteriza-se pelo facto de a incubação da COX numa certa concentração de inibidor resultar numa perda de atividade que se acentua ao longo do tempo e de a diminuição da concentração de inibidor fazer com que a atividade seja recuperada lentamente. Este tipo de mecanismo inicia com uma ligação rápida e reversível do inibidor ao centro ativo, seguida de uma mudança conformacional lenta do monómero ao qual se ligou, a qual é revertida ainda mais lentamente.¹ Nos mecanismos independentes do tempo, também chamados de rapidamente reversíveis, a inibição decorre num único passo de ligação.⁸

Deste modo, a tendência atual é para os inibidores das COX serem classificados não só quanto à cinética, mas também quanto ao(s) monómero(s) a cujo centro ativo se ligam,¹ como mostram os exemplos da Tabela 3, relativos à inibição da COX-2.

Tabela 3: Exemplos de mecanismos de inibição da COX-2.^{1,29}

Cinética	Independente do tempo	Dependente do tempo	
		Ibuprofeno Ácido mefenâmico	Naproxeno
Monómero(s)	$E_{\text{allo}} + E_{\text{cat}}$	E_{allo}	E_{cat}

2.3.1. Inibição irreversível

O único AINE comercializado que inibe as COX de forma irreversível é o AAS.⁴ Tal deve-se ao estabelecimento de uma ligação covalente com a enzima ao nível do centro ativo ciclo-oxigenase, mais precisamente pela acetilação do resíduo de serina na posição 530 (Ser-530).³⁰ Na conversão do AA em PGG₂, a molécula do substrato deve estar posicionada de tal modo que o carbono 15 fique próximo desse resíduo de aminoácido.¹¹ A molécula de AAS, ao entrar no canal do centro ativo, estabelece interações com resíduos de aminoácidos. Tem sido proposto que um dos primeiros a intervir é a Arg-120, que estabelece uma interação iónica com o grupo carboxilo do AAS, contribuindo para que este adote uma posição favorável à interação posterior com outros aminoácidos específicos.³⁰ Estes incluem a Tyr-348 e, sobretudo, a Tyr-385, cujo grupo hidroxilo estabelece uma ligação de hidrogénio com o átomo de oxigénio do grupo acetilo do AAS.³⁰ Estas interações colocam o AAS numa posição relativa à Ser-530 que permite que ocorra uma reação de transesterificação (substituição nucleofílica de acilo) entre o grupo acetilo do AAS e o grupo hidroxilo daquele aminoácido, resultando na acetilação da Ser-530 e na libertação de ácido salicílico.³⁰ Embora uma reação deste tipo pudesse decorrer em dois passos (adição com formação de um intermediário tetraédrico, seguida de eliminação), tem sido proposto que nesta situação ocorre num único passo envolvendo um estado de transição.^{30,31}

O facto de este mecanismo de inibição ser exclusivo do AAS explica que este seja o AINE indicado na diminuição da agregação plaquetar, uma vez que a COX presente nas plaquetas fica permanentemente inibida e, como essas células não conseguem produzir a enzima novamente, a inibição é mantida até ao fim do seu tempo de vida na corrente sanguínea.¹³

2.3.2. Inibição reversível

Os restantes AINEs inibem as COX pelo estabelecimento de interações não covalentes com resíduos de aminoácidos do centro ativo.⁸ A Tabela 4 mostra alguns exemplos dessas interações.

Tabela 4: Exemplos de interações entre AINEs e COX importantes na inibição reversível.

Fármaco	Isoforma	Interações
Ibuprofeno	COX-1	O grupo carboxilo estabelece uma ligação iónica com Arg-120 e uma ligação de hidrogénio com Tyr-355. ³² A existência de uma ligação iónica ou de hidrogénio com Arg-120 parece ser muito relevante para vários ácidos carboxílicos, como a indometacina e o flurbiprofeno. ⁸
Diclofenac Cetorolac	COX-2	O grupo carboxilo estabelece ligações de hidrogénio com Ser-530 e Tyr-385. O grupo diclorofenilo estabelece interações van der Waals com Val-349, Ala-527 e Leu-531. ³²
Indometacina	COX-2	O grupo 2'-metilo do anel indólico contacta com uma região hidrofóbica que inclui os resíduos Val-349, Ala-527, Ser-530 e Leu-531, numa interação determinante para a inibição. ⁸

3. DERIVADOS DE ÁCIDOS CINÂMICOS COMO MOLÉCULAS COM ATIVIDADE FARMACOLÓGICA

O ácido cinâmico (ou ácido 3-fenilpropenóico) é um composto presente em óleos essenciais de diversas plantas, tanto na forma livre como na forma de ésteres. A introdução de substituintes no seu anel aromático permite obter uma grande variedade de compostos que recebem a designação genérica de ácidos cinâmicos³³ (Figura 1).

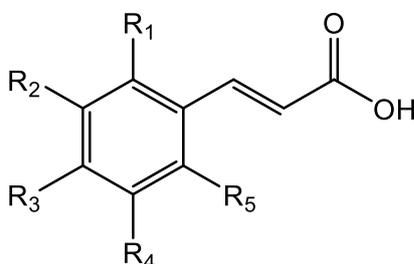


Figura 1: Estrutura geral dos ácidos cinâmicos.

3.1. Hexilamidas de ácidos cinâmicos com atividade antioxidante

Um estudo de 2010³⁴ focou-se na síntese e estudo da atividade antioxidante de derivados de ácidos cinâmicos e hidrocínâmicos (estes distinguem-se dos primeiros por não serem α,β -insaturados), com o objetivo de estudar o seu potencial no desenvolvimento de novos tratamentos para doenças neurodegenerativas. Os compostos estudados neste âmbito foram os ácidos cafeico, hidrocafeico, ferúlico, hidroferúlico, e as hexilamidas e hexilésteres daqueles quatro. O estudo da atividade consistiu na quantificação da diminuição da peroxidação de lípidos membranares de lipossomas induzida pelos compostos.³⁴ Os resultados mostraram que os ácidos cinâmicos e seus derivados (α,β -insaturados) são mais ativos do que os seus análogos saturados, e ainda que o ácido cafeico e seus derivados são mais ativos que os seus análogos ferúlicos, isto é, a presença de um grupo 3-hidroxilo em vez de 3-metoxilo no anel aromático aumenta a atividade.³⁴ Em cada grupo de derivados do mesmo ácido, o composto com menor atividade foi precisamente o próprio ácido; no caso do ácido cafeico, foi o hexiléster que teve maior atividade, enquanto no caso do ácido ferúlico, foi a hexilamida.³⁴ A medição dos potenciais de redução dos compostos também ilustrou que a troca do grupo 3-metoxilo por 3-hidroxilo no anel aromático faz diminuir o respetivo valor, o que está em concordância com a quantificação da atividade.³⁴

3.2. Hexilamidas de ácidos cinâmicos com atividade antitumoral

No seguimento dos resultados de várias investigações que sugeriram a existência de um efeito anti-proliferativo de vários ácidos hidroxicinâmicos sobre diversos tipos de células tumorais, um estudo de 2016³⁵ focou-se na determinação da atividade antitumoral de três desses ácidos – ferúlico, cafeico e 3,4,5-tri-hidroxicinâmico – e das respetivas hexilamidas, tendo sido avaliado o seu efeito sobre a explosão oxidativa de neutrófilos humanos e sobre a proliferação das células de duas linhas tumorais colo-retais. No primeiro caso, procedeu-se à quantificação da diminuição da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) após indução de explosão oxidativa, verificando-se que, excetuando os compostos tri-hidroxicinâmicos, as hexilamidas foram significativamente mais ativas do que os correspondentes ácidos; além disso, a hexilamida do ácido cafeico foi mais ativa que a do ácido ferúlico, tendo estas sido os compostos mais ativos de todos os estudados.³⁵ Relativamente à atividade anti-proliferativa, as conclusões foram idênticas, com a diferença de que os ácidos ferúlico e cafeico não mostraram atividade e que a hexilamida do ácido cafeico destacou-se de todos os outros compostos pela sua maior atividade, sugerindo uma

relação entre a presença de grupos 3-hidroxilo e 4-hidroxilo no anel aromático (grupo catecol) e o aumento da atividade.³⁵ Esse composto foi estudado com mais pormenor numa tentativa de detalhar o mecanismo de ação anti-proliferativo, tendo-se concluído que aquele induz o aumento da produção de ROS nas células tumorais e a diminuição do respetivo potencial de membrana mitocondrial, o que cria condições para que ocorra apoptose.³⁵

3.3. Ésteres de ácidos cinâmicos com atividade inibitória das ciclo-oxigenases

Um estudo de 2015³⁶ focou-se na determinação da atividade inibitória das COX dos ácidos p-cumárico, cafeico e 3,4,5-tri-hidroxicinâmico, bem como dos respetivos ésteres etílicos e dietílicos (neste último tipo de compostos, o carbono α está ligado a duas funções éster). A quantificação do efeito inibitório da COX-1 e da COX-2 foi efetuada por um ensaio em sangue humano total, concluindo que os ácidos cinâmicos revelaram baixa ou nula atividade para ambas as COX.³⁶ Por sua vez, os ésteres etílicos foram os compostos mais ativos na inibição da COX-1, enquanto os ésteres dietílicos foram os mais ativos na inibição da COX-2. O composto mais ativo e com maior seletividade para a COX-2 foi o éster dietílico do ácido cafeico.³⁶

4. SÍNTESE, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HEXILAMIDAS DE ÁCIDOS CINÂMICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS CICLO-OXIGENASES

A partir deste ponto e até ao final da presente monografia, será abordado um trabalho de investigação levado a cabo no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, integrado num projeto que teve como objetivo a síntese, purificação e caracterização de hexilamidas de ácidos cinâmicos e o estudo da sua atividade inibitória das COX.

4.1. Fundamentação teórica

4.1.1. Seleção dos compostos a sintetizar

No estudo referido no subcapítulo 3.1 sobre a atividade antioxidante de hexilamidas e hexilésteres de ácidos cinâmicos,³⁴ realizou-se a medição do coeficiente de partilha octanol-água dos compostos, o qual é expresso no respetivo logaritmo (log P). Verificou-se que a incorporação do grupo hexilo nas amidas e ésteres aumentou os respetivos valores

em comparação com os ácidos cinâmicos, o que se traduz em maior lipofilia. Os valores de log P dessas amidas eram inclusivamente compatíveis com os teoricamente previstos para permitir a passagem dos compostos através de membranas biológicas.³⁴

Esta abordagem pode ser aprofundada pela aplicação da Regra de Lipinski, segundo a qual a previsão da capacidade de um composto de ser absorvido e de transpor membranas biológicas passivamente, relacionada com a sua solubilidade e permeabilidade, pode ser feita pela aplicação de quatro critérios: peso molecular, log P, número de doadores de ligações de hidrogénio e número de aceitadores de ligações de hidrogénio.³⁷ Todos os requisitos foram cumpridos pelas hexilamidas de ácidos cinâmicos estudadas.³⁴ No mesmo trabalho, foi proposto que a maior lipofilia das hexilamidas foi a causa do aumento da atividade face aos respetivos ácidos, uma vez que, preservando a sua capacidade de interagirem com grupos polares de moléculas das membranas, podiam atingir maiores concentrações nas proximidades destas.³⁴

Também no estudo da atividade antitumoral de hexilamidas referido no subcapítulo 3.2,³⁵ foi proposto que a maior lipofilia daquelas comparativamente aos respetivos ácidos, em consequência da incorporação do grupo hexilo, foi responsável pela sua maior atividade devido à maior facilidade em atravessar membranas, aumentando a sua concentração intracelular.³⁵

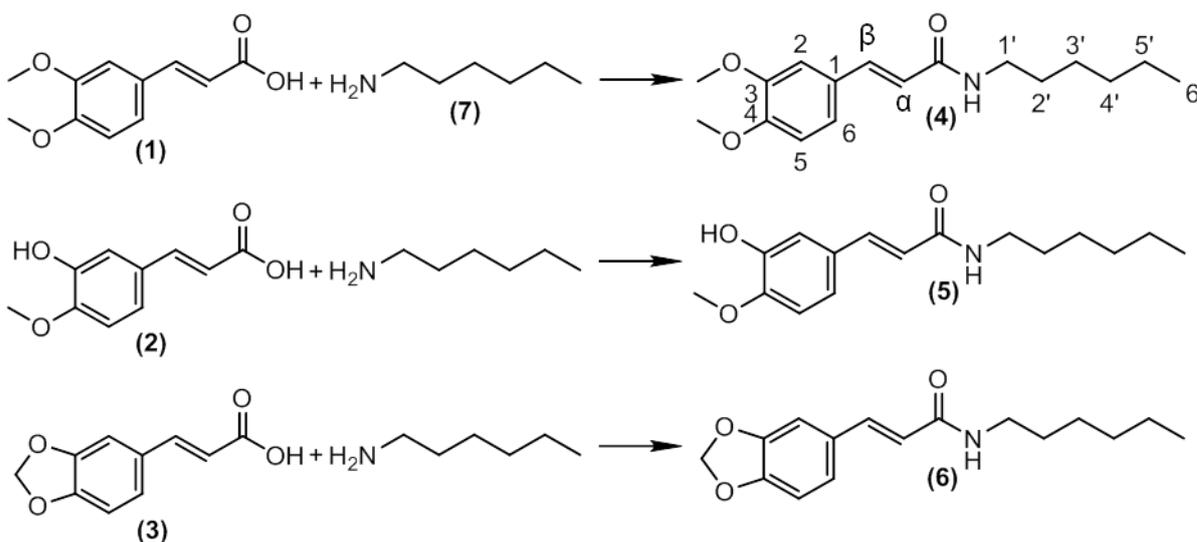
É ainda sugerido por alguns autores que o valor de log P ideal, que confere a um composto a lipofilia mais adequada para alcançar o seu alvo farmacológico, é alcançado pela presença na respetiva estrutura de uma cadeia alquilada com 5 a 9 átomos de carbono.¹³ Deste modo, as hexilamidas de ácidos cinâmicos podem preservar ou potenciar a atividade de compostos estruturalmente relacionados. O estudo já referido sobre compostos com atividade inibitória das COX³⁶ pode ser um indício de que será possível sintetizar hexilamidas de ácidos cinâmicos com o mesmo tipo de atividade.

No âmbito deste projeto de investigação, foram selecionados vários ácidos cinâmicos para se realizar a síntese e avaliação da atividade inibitória sobre as COX das respetivas hexilamidas. Destas, três serão referidas na presente monografia, sintetizadas a partir dos ácidos 3,4-dimetoxicinâmico, 3-hidroxi-4-metoxicinâmico (também chamado isoferúlico) e 3,4-(metilenodioxo)cinâmico. O Esquema I resume as reações de conversão dos ácidos cinâmicos em estudo nas respetivas hexilamidas.

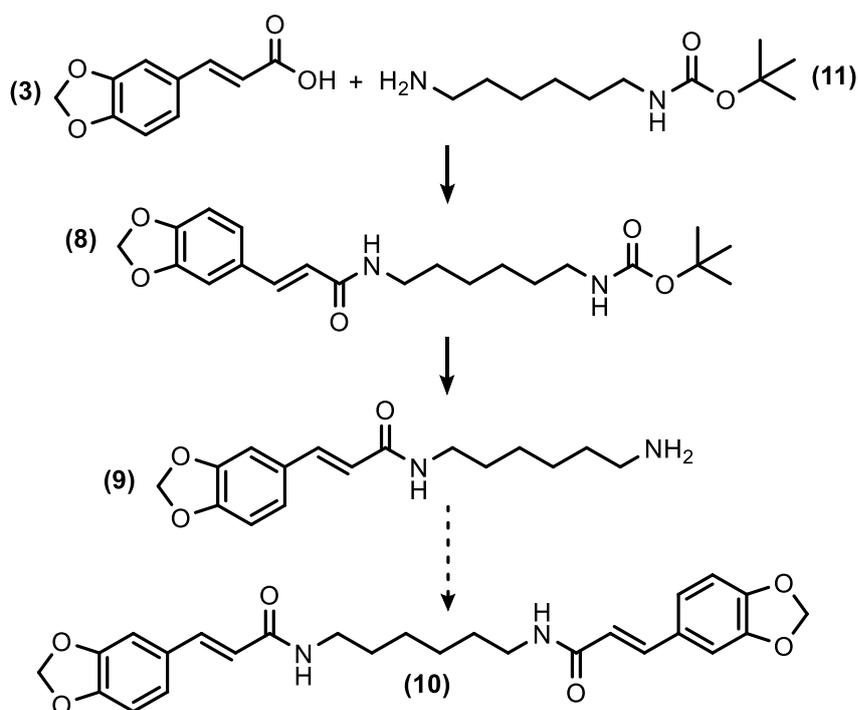
Ao supor que, à semelhança dos estudos anteriores com hexilamidas de ácidos cinâmicos, a porção do ácido cinâmico dos compostos será determinante para a sua atividade, optou-se ainda por explorar a hipótese de sintetizar compostos com uma cadeia alquilada de 6 átomos de carbono, mas com duas unidades de ácido cinâmico; isto é,

compostos do tipo *N,N'*-diacil-1,6-diamino-hexano, a partir do respectivo ácido cinâmico e de um 1,6-diamino-hexano modificado. Esta abordagem só foi iniciada para o ácido 3,4-(metilenodioxi)cinâmico, no sentido de testar um método de síntese deste tipo de compostos, e não chegou a ser concluída até à data. Porém, por se tratar de uma síntese que envolve três reações sequenciais (Esquema 2), das quais duas foram concretizadas, será feita a devida referência.

A Tabela 5 e os Esquemas 1 e 2 estabelecem um sistema de identificação numérica para os compostos envolvidos neste trabalho de investigação, que servirá para abreviar a designação dos mesmos até ao final da presente monografia.



Esquema 1: Reações de síntese de hexilamidas de ácidos cinâmicos e respetivo sistema de numeração dos átomos de carbono.



Esquema 2: Sequência reacional de síntese de compostos com duas funções amida.

Tabela 5: Identificação numérica de compostos.

Número	Nome
1	ácido 3,4-dimetoxicinâmico
2	ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico
3	ácido 3,4-(metilenodioxi)cinâmico
4	hexilamida do ácido 3,4-dimetoxicinâmico
5	hexilamida do ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico
6	hexilamida do ácido 3,4-(metilenodioxi)cinâmico
7	hexilamina
8	<i>N</i> -(3,4-(metilenodioxi)cinamoil)- <i>N'</i> - <i>tert</i> -butiloxicarbonil-1,6-diamino-hexano
9	<i>N</i> -(3,4-(metilenodioxi)cinamoil)-1,6-diamino-hexano
10	<i>N,N'</i> -di(3,4-(metilenodioxi)cinamoil)-1,6-diamino-hexano
11	<i>N-tert</i> -butiloxicarbonil-1,6-diamino-hexano

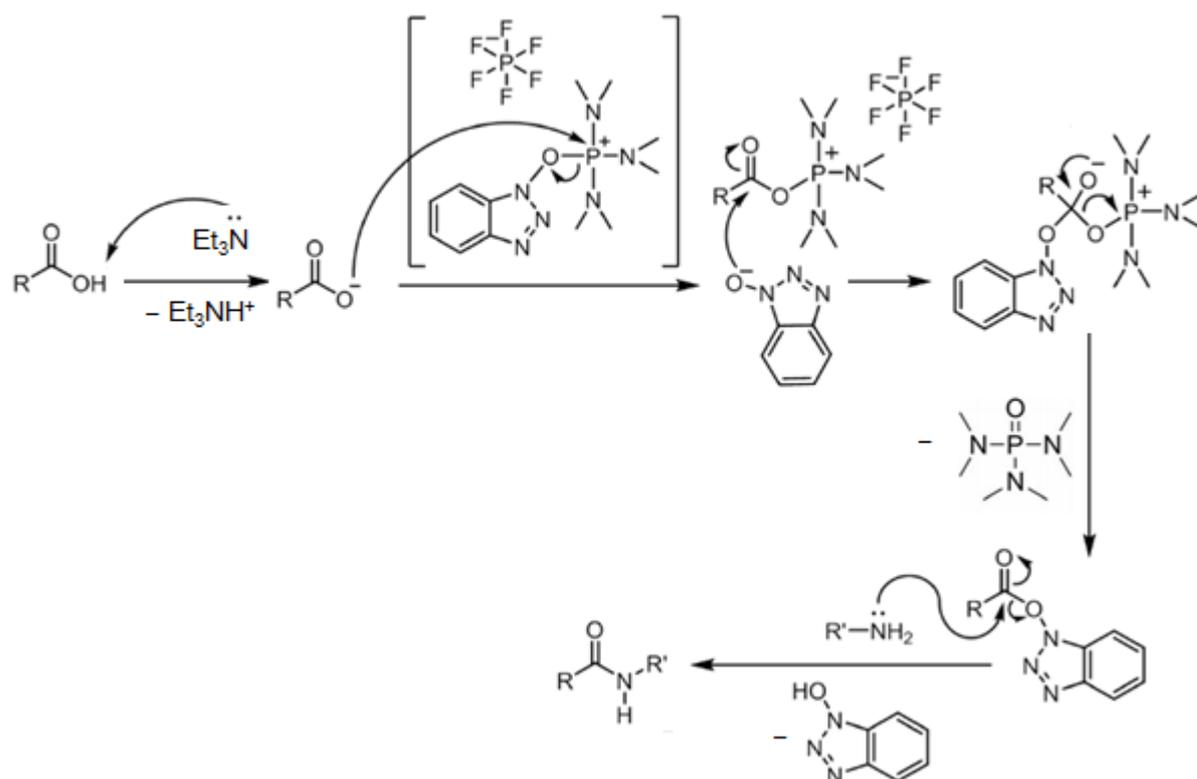
4.1.2. Métodos de síntese e mecanismos reacionais

Uma amida poderia ser sintetizada diretamente a partir de um ácido carboxílico e de uma amina, numa única reação de substituição de acilo por adição-eliminação.¹² Neste caso, o primeiro passo da reação seria a ligação do grupo amina, nucleófilo, ao átomo de carbono

do grupo carboxilo, formando um intermediário tetraédrico.¹² Porém, a execução prática deste tipo de reação é dificultada pelo facto de as amins, dentro dos reagentes comuns nas reações de substituição de acilo, serem as melhores bases, pelo que há tendência para ocorrer uma reação ácido-base, com a amina a captar o protão carboxílico.¹² Assim, uma reação direta entre um ácido e uma amida só ocorreria se fossem criadas condições próprias, nomeadamente uma temperatura bastante elevada, pelo que se torna necessário substituir o ácido carboxílico por um derivado ativado.¹²

A obtenção de derivados ativados de ácidos cinâmicos pode ser feita com recurso a um sal denominado hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfónio (BOP) e a uma base, a trietilamina (TEA), estando todos os reagentes dissolvidos num solvente orgânico adequado, como a dimetilformamida (DMF).³⁸ A TEA desprotona o ácido cinâmico no grupo carboxilo, fazendo com que o carboxilato se ligue, pelo átomo de oxigénio com carga negativa, ao átomo de fósforo do catião do BOP, que tem carga positiva, formando um éster de fósforo; o grupo que antes estava ligado ao átomo de fósforo liberta-se sob a forma de anião benzotriazol-1-óxido.³⁹ Trata-se de um nucleófilo, que se vai ligar ao átomo de carbono da função éster,³⁹ originando um intermediário tetraédrico. Segue-se a eliminação do grupo fosforado sob a forma de hexametilfosforamida (HMPA), formando-se um novo éster.³⁹ Este composto constitui um derivado ativado do ácido cinâmico inicial e já está em condições de reagir com a hexilamina numa reação de substituição de acilo por adição-eliminação, originando a amida (Esquema 3).³⁹ Deve ser referido que a HMPA é um composto tóxico e cancerígeno,⁴⁰ pelo que a aplicabilidade desta técnica está restringida a sínteses de pequena escala.

Na sequência desta técnica de síntese, deve ser realizado *work-up* da mistura reacional, adicionando em primeiro lugar ácido clorídrico (HCl)³⁴ para neutralizar bases, nomeadamente TEA, formando-se cloridrato de TEA. Em seguida, adiciona-se água,³⁴ para remover o sal formado. Depois, a mistura é tratada com hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO₃),³⁴ para neutralizar o excesso de HCl, e por fim volta-se a adicionar água³⁴ para eliminar o excesso de NaHCO₃.



Esquema 3: Mecanismo de síntese de hexilamidas de ácidos cinâmicos com recurso a BOP.

Relativamente à síntese de compostos do tipo N,N' -diacil-1,6-diamino-hexano, com duas funções amida, chegou a ser considerada uma reação direta da hexametilenodiamina com dois equivalentes de um ácido cinâmico. Porém, verificou-se experimentalmente que uma reação nestas condições não origina nem o produto pretendido, nem o respetivo precursor com apenas uma unidade de ácido cinâmico. Deste modo, optou-se por introduzir uma função amida de cada vez. Para este efeito, é utilizado um derivado da referida diamina, o qual tem um grupo protetor BOC (*terc*-butiloxicarbonilo) ligado a um dos átomos de azoto. Assim, a primeira reação introduz uma ligação amida entre o ácido cinâmico e a diamina modificada, segundo os princípios já descritos neste subcapítulo (síntese através de um derivado ativado com recurso a BOP). A segunda reação conduz à desproteção da amina pela remoção do grupo BOC, através do tratamento do produto da primeira reação com uma mistura de HCl e metanol 1:1, em metanol, à temperatura ambiente.⁴¹ A terceira reação, que até à data não foi realizada, iria consistir na reação entre o grupo amina livre e uma outra molécula do ácido cinâmico utilizado, em moldes idênticos à primeira reação, introduzindo a segunda função amida e levando à obtenção do produto pretendido.

4.2. Materiais, equipamentos e reagentes

O progresso de todas as reações foi controlado por cromatografia em camada fina (TLC) usando placas de sílica gel 60 F254, as quais foram reveladas primeiro sob luz ultravioleta e depois com vapor de iodo. Nas cromatografias em coluna, utilizou-se sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm) como fase estacionária. Os intervalos de fusão (Pf) dos compostos sintetizados foram determinados num aparelho Büchi Melting Point B-540. Todos os espectros infravermelho (IV) foram obtidos num espectrómetro Jasco 420FT/IR. Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , foram obtidos num Varian Unity 400 a frequências de 400 MHz e 100 MHz, respetivamente, e os desvios químicos foram registados em valores δ em partes por milhão (ppm) relativamente ao padrão interno utilizado – tetrametilsilano; os valores das constantes de acoplamento (J) são expressos em hertz (Anexos 5 a 8).

Quanto aos fornecedores dos principais reagentes usados, o composto **1** foi adquirido junto da Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Alemanha), o composto **2** junto da Carbosynth Limited (Berkshire, Reino Unido) e o composto **3** junto da Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemanha).

4.3. Procedimento geral para a síntese, purificação e caracterização das hexilamidas dos ácidos 3,4-dimetoxicinâmico (**4**), 3-hidroxi-4-metoxicinâmico (**5**) e 3,4-(metilenodioxi)cinâmico (**6**)

A síntese das amidas **4**, **5** e **6** foi realizada a partir dos ácidos cinâmicos **1**, **2** e **3**, respetivamente, os quais foram inicialmente dissolvidos em dimetilformamida (DMF) e trietilamina (TEA). A solução assim obtida foi arrefecida num banho de água com gelo e procedeu-se à adição sequencial de hexilamina e de uma solução de hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfónio (BOP) em diclorometano (CH_2Cl_2), preparada imediatamente antes. O sistema foi colocado em agitação à temperatura de $0\text{ }^\circ\text{C}$ durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante um período de tempo específico para cada reação (mantendo a agitação). Posteriormente, o CH_2Cl_2 foi removido a pressão reduzida e a mistura resultante foi diluída com 70 mL de água destilada. Procedeu-se a uma extração com 2 porções de 70 mL de acetato de etilo, que foram imediatamente reunidas e lavadas com 2 porções de 70 mL de HCl 1 N, 70 mL de água destilada, 2 porções de 70 mL de solução de NaHCO_3 a 5% e, por fim, mais 70 mL de água destilada. Realizou-se a secagem da fase orgânica com sulfato de magnésio (MgSO_4) anidro, sendo depois filtrada e concentrada a pressão reduzida. Obteve-se um *crude* que foi purificado por recristalização

e/ou por cromatografia em coluna, resultando nas hexilamidas correspondentes (compostos **4**, **5** e **6**).

4.3.1. *N*-hexil-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-propenamida (**4**)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,0 mg (2,40 mmol) de composto **1**; 5,5 mL de DMF; 0,34 mL de TEA; 0,32 mL (2,40 mmol) de hexilamina; 1,06 g (2,40 mmol) de BOP; e 5 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0 °C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 4 h 45 min. O progresso da reação foi controlado por TLC, comparando uma solução do composto **1** em acetato de etilo com uma amostra do sistema reacional, usando como fases móveis uma mistura de éter de petróleo e acetato de etilo 5:5 e uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1. O *crude* obtido após *work-up* foi purificado por recristalização com acetato de etilo, resultando em 532,4 mg de composto **4**, o que corresponde a um rendimento de 76%. $Pf_{(\text{acetato de etilo})}$ 95-98 °C. IV (ATR) ν_{max} cm⁻¹: 3283 (N-H), 1650 (C=O), 1136 (C-O). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 0,87 (3H, t, *J* = 6,5, -CH₃), 1,27 (6H, m, -CH₂(3'-5')), 1,44 (2H, m, -CH₂(2')), 3,15 (2H, m, -CH₂(1')), 3,78 (3H, s, -OCH₃), 3,79 (3H, s, -OCH₃), 6,49 (1H, d, *J* = 15,7, -CH(α)), 6,97 (1H, d, *J* = 8,3, -CH(5)), 7,10 (1H, dd, *J* = 6,8, *J* = 1,5, -CH(6)), 7,14 (1H, s, -CH(2)), 7,33 (1H, d, *J* = 15,7, -CH(β)), 7,95 (1H, t, *J* = 5,5, -NH). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 13,8 (CH₃), 22,0 (C-5'), 26,1 (C-4'), 29,1 (C-3'), 30,9 (C-2'), 38,5 (C-1'), 55,3, 55,4 (-OCH₃), 109,8 (C-5), 111,6 (C-6), 120,0 (C-2), 121,2 (C- α), 127,7 (C-1), 138,3 (C- β), 148,8 (C-4), 149,9 (C-3), 165,0 (C=O).

4.3.2. *N*-hexil-3-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2-propenamida (**5**)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,0 mg (2,57 mmol) de composto **2**; 6 mL de DMF; 0,36 mL de TEA; 0,34 mL (2,57 mmol) de hexilamina; 1,14 g (2,57 mmol) de BOP; e 6 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0 °C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 5 h. O progresso da reação foi controlado por TLC, comparando uma solução do composto **2** em acetato de etilo com uma amostra do sistema reacional, usando como fases móveis uma mistura de éter de petróleo e acetato de etilo 4:6 e uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1. O *crude* obtido após *work-up* foi purificado por cromatografia em coluna usando uma mistura de hexano e acetato de etilo como fase móvel, resultando em 306,5 mg de composto **5**, o que corresponde a um rendimento de 43%. $Pf_{(\text{hexano} / \text{acetato de etilo})}$ 102-103 °C. IV (ATR) ν_{max} cm⁻¹: 3321 (O-H e N-H), 1642 (C=O), 1126

(C–O). ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0,87 (3H, t, *J* = 6,8, –CH₃), 1,27 (6H, m, –CH₂(3'-5')), 1,43 (2H, m, –CH₂(2')), 3,14 (2H, m, –CH₂(1')), 3,79 (3H, s, –OCH₃), 6,38 (1H, d, *J* = 15,7, –CH(α)), 6,93 (2H, m, –CH(5,6)), 6,96 (1H, bs, –CH(2)), 7,25 (1H, d, *J* = 15,7, –CH(β)), 7,96 (1H, t, *J* = 5,6, –NH), 9,15 (1H, s, –OH). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13,8 (CH₃), 22,0 (C-5'), 26,1 (C-4'), 29,1 (C-3'), 30,9 (C-2'), 38,5 (C-1'), 55,5 (–OCH₃), 112,0 (C-α), 113,2 (C-6), 119,6 (C-2), 120,0 (C-5), 127,8 (C-1), 138,4 (C-β), 146,6 (C-4), 149,0 (C-3), 165,0 (C=O).

4.3.3. *N*-hexil-3-(3,4-(metilendioxi)fenil)-2-propenamida (**6**)

Na síntese deste composto foram utilizados: 500,0 mg (2,60 mmol) de composto **3**; 6 mL de DMF; 0,37 mL de TEA; 0,34 mL (2,60 mmol) de hexilamina; 1,15 g (2,60 mmol) de BOP; e 6 mL de CH₂Cl₂. A reação decorreu com agitação a 0 °C durante 30 min e depois à temperatura ambiente durante 5 h 30 min. O progresso da reação foi controlado por TLC, comparando uma solução do composto **3** em CH₂Cl₂ com uma amostra do sistema reacional, usando como fases móveis uma mistura de éter de petróleo e acetato de etilo 5:5 e uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1. O *crude* obtido após *work-up* foi purificado por recristalização com acetato de etilo, resultando em 472,3 mg de composto **6**, o que corresponde a um rendimento de 66%. *Pf*_(acetato de etilo) 80-81 °C. IV (ATR) *v*_{max} cm⁻¹: 3305 (N–H), 1647 (C=O), 1604 (C=C), 1527 (N–H), 1253 (C–N), 1037 (C–O). ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 0,86 (3H, t, *J* = 7, –CH₃), 1,35 (8H, m, –CH₂(2'-5')), 3,14 (2H, m, –CH₂(1')), 6,06 (2H, s, –O–CH₂–O–), 6,45 (1H, d, *J* = 15,7, –CH(α)), 6,93 (1H, d, *J* = 7,65, –CH(6)), 7,05 (1H, dd, *J*_{5,6} = 7,65, *J*_{5,2} = 1,55, –CH(5)), 7,12 (1H, d, *J*_{2,5} = 1,55, –CH(2)), 7,31 (1H, d, *J* = 15,7, –CH(β)), 7,95 (1H, t, *J* = 5,5, –NH). ¹³C RMN (125 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 13,8 (CH₃), 21,9 (C-5'), 26,1 (C-4'), 29,0 (C-3'), 30,9 (C-2'), 38,6 (C-1'), 101,3 (O-CH₂-O), 106,0 (C-α), 108,4 (C-6), 120,4 (C-5), 122,9 (C-2), 129,3 (C-1), 138,0 (C-β), 147,8 (C-4), 148,2 (C-3), 164,8 (C=O).

4.4. Procedimento para a obtenção e purificação dos compostos precursores do *N,N'*-di(3,4-(metilenodioxifenil)-2-propenoil)-1,6-diamino-hexano (10)

4.4.1. *N*-(3-(3,4-(metilenodioxifenil)-2-propenoil)-*N'*-terc-butiloxicarbonil-1,6-diamino-hexano (8)

Uma porção de 277,2 mg (1,44 mmol) do composto **3** foi dissolvida em 3,5 mL de DMF e 0,21 mL de TEA, obtendo-se uma solução que foi prontamente arrefecida num banho de água com gelo. Foram adicionados 0,33 mL (1,44 mmol) de *N*-BOC-1,6-diamino-hexano, seguidos de uma solução de 637,5 mg (1,44 mmol) de BOP em 4 mL de CH₂Cl₂. O sistema reacional foi mantido, sempre sob agitação, a 0 °C durante 30 min, e depois à temperatura ambiente durante 4 h 30 min. O progresso da reação foi controlado por TLC, comparando uma solução do composto **3** em CH₂Cl₂ com uma amostra do sistema reacional, usando como fases móveis uma mistura de hexano e acetato de etilo 3:7 (que foi alterada no decurso da reação para 4:6) e uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1. Terminada a reação, o CH₂Cl₂ foi removido a pressão reduzida e a mistura resultante foi diluída com 70 mL de água destilada. Procedeu-se a uma extração com 2 porções de 70 mL de acetato de etilo, que foram imediatamente reunidas e lavadas com 2 porções de 70 mL de HCl 1 N, 70 mL de água destilada, 2 porções de 70 mL de solução de NaHCO₃ a 5% e por fim mais 70 mL de água destilada. Realizou-se a secagem da fase orgânica com MgSO₄ anidro, sendo depois filtrada e concentrada a pressão reduzida. Obteve-se um *crude* que foi purificado por recristalização em acetato de etilo, originando 290,6 mg de composto **8**, o que corresponde a um rendimento de 52%. Uma nova análise por TLC revelou que o produto obtido ainda continha impurezas, pelo que se realizou uma cromatografia em coluna usando uma mistura de hexano e acetato de etilo como fase móvel. Foram obtidos 264,8 mg de composto **8**, correspondentes a um rendimento de 47%, dos quais se recolheu uma quantidade analítica de uma fração altamente pura para se efetuar a medição do intervalo de fusão. $Pf_{(\text{hexano} / \text{acetato de etilo})}$ 129-130 °C.

4.4.2. *N*-(3-(3,4-(metilenodioxifenil)-2-propenoil)-1,6-diamino-hexano (9)

Uma porção de 167,7 mg (0,43 mmol) do composto **8** foi dissolvida em 15 mL de metanol. Colocou-se esta solução em agitação à temperatura ambiente e foi-lhe adicionado 1 mL de uma mistura de HCl e metanol 1:1, gota a gota. O progresso da reação foi controlado por TLC, usando como fases móveis uma mistura de hexano e acetato de etilo 4:6 e uma mistura de clorofórmio e metanol 9:1. A reação decorreu durante 24 h, sempre

com agitação à temperatura ambiente. Procedeu-se à remoção do metanol a pressão reduzida. A mistura obtida foi colocada num banho de gelo, com agitação, e foi-lhe adicionada solução de NaHCO₃ a 10%, gota a gota, até o pH da mistura alcançar um valor entre 8 e 9, tendo sido usados 60 mL da referida solução. Fez-se extração da mistura com 3 porções de 70 mL de acetato de etilo, as quais foram reunidas e lavadas com 3 porções de 70 mL de água destilada. Realizou-se a secagem da fase orgânica com sulfato de sódio (Na₂SO₄) anidro, sendo depois filtrada e concentrada a pressão reduzida. Foram obtidos 21,0 mg de composto **9**, o que corresponde a um rendimento de 17%.

5. ESTUDO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS SINTETIZADOS SOBRE AS CICLO-OXIGENASES

5.1. Fundamento teórico e resumo do método

A atividade inibitória das hexilamidas sintetizadas sobre as COX foi quantificada através de um ensaio *in vitro* em sangue venoso total, colhido de voluntários humanos saudáveis após consentimento informado.

O ensaio de inibição da COX-I envolveu o tratamento da amostra biológica com TXBSI (inibidor da tromboxano sintetase) e o composto em estudo, seguido da adição de ionóforo de cálcio para ativar a conversão de AA pela COX-I nas plaquetas.⁴²

No ensaio de inibição da COX-2, a amostra biológica foi inicialmente tratada com TXBSI, composto em estudo e ácido acetilsalicílico (inibidor irreversível da COX-I), adicionando-se posteriormente lipopolissacarídeo de uma estirpe bacteriana para induzir a expressão da COX-2,⁴³ sobretudo nos monócitos.⁴⁴

Em ambos os ensaios, a catálise enzimática foi cessada pela colocação das amostras em gelo, sendo as mesmas centrifugadas e os respetivos sobrenadantes recolhidos e armazenados a baixa temperatura. A determinação da atividade inibitória das COX foi efetuada pela quantificação de PGE₂ nas amostras biológicas através de um ensaio imunoenzimático. Foram testadas várias concentrações dos compostos em análise: 3,1 a 100 µM para a COX-I e 0,08 a 100 µM para a COX-2.

5.2. Resultados e discussão

A Tabela 6 mostra a percentagem de inibição de cada isoforma da COX alcançada por cada composto, tendo como referência (controlo positivo) a inibição provocada nas mesmas condições pela indometacina e pelo celecoxib na concentração de 1 µM.

Tabela 6: Resultados da quantificação da atividade inibitória das hexilamidas sobre as COX.

Composto	Inibição da COX-1 (%) *	Inibição da COX-2 (%) *	log P **
4	N.A.*** (100 µM)	N.A. (100 µM)	2,91
5	12,5 µM - 56±9 % 100 µM - 85±6 %	12,5 µM - 10±5 % 100 µM - 79±7 %	2,63
6	N.A. (100 µM)	N.A. (100 µM)	3,37

* Dados obtidos pelo grupo da Prof.^a Doutora Eduarda Fernandes (UCIBIO/REQUIMTE, Laboratório de Química Aplicada, Departamento de Ciências Químicas, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto)

** Estimativa obtida através do *software* ChemDraw® (PerkinElmer, Inc.)

*** N.A. = não ativo

Os compostos **4** e **6**, isto é, as hexilamidas dos ácidos 3,4-dimetoxicinâmico e 3,4-(metilenodioxi)cinâmico, revelaram ausência de atividade inibidora das COX em todo o intervalo de concentrações estudado.

Por sua vez, o composto **5** (hexilamida do ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico) inibe tanto a COX-1 como a COX-2. Em ambas as isoformas, a extensão de inibição cresce com o aumento da concentração do composto. A extensão de inibição da COX-1 foi superior à da COX-2 em ambas as concentrações testadas, mas com maior diferença em 12,5 µM: o rácio de seletividade (aqui definido como a razão entre a extensão de inibição da COX-1 e da COX-2) foi igual a 5,6 para esta concentração, enquanto para 100 µM foi igual a 1,1. Estamos, portanto, perante um inibidor da COX-1 e da COX-2, mas sobretudo da primeira. Deve ser tido em conta que a melhor estimativa da seletividade de um inibidor das COX é obtida a partir dos valores de IC₅₀ (concentração de inibidor que causa 50% da inibição máxima),⁴⁵ parâmetro que não foi determinado neste estudo.

A comparação das estruturas das hexilamidas testadas mostra que as únicas diferenças estruturais entre os compostos residem nos substituintes do anel aromático, o que significa que estes são determinantes da atividade inibitória das COX deste tipo de moléculas. O composto **4** apresenta, no anel, grupos 3-metoxilo e 4-metoxilo e o composto **6** um grupo 3,4-metilenodioxi: como nenhum destes compostos mostrou ser ativo, parece que nenhum dos grupos referidos confere atividade às hexilamidas de ácidos cinâmicos. Por sua vez, a substituição no anel do grupo 3-metoxilo por um 3-hidroxilo, que é a única diferença entre os compostos **4** e **5**, conferiu à hexilamida atividade inibitória da COX-1 e da COX-2, sobretudo da primeira. Poder-se-á assim prever que a presença de um grupo 3-hidroxilo no anel aromático de uma hexilamida de um ácido cinâmico confere ou aumenta

a sua atividade inibitória das COX, provavelmente por permitir o estabelecimento de ligações de hidrogénio adicionais com o centro ativo.

Considerando que a quantificação da atividade foi realizada por um ensaio em sangue total, pode-se prever que as três hexilamidas estudadas conseguiram alcançar o alvo farmacológico em estudo – as COX, localizadas dentro das células – uma vez que a presença do grupo hexilo lhes conferiu maior lipofilia, permitindo-lhes atravessar a membrana das células sanguíneas com maior facilidade. Deste modo, as diferenças de atividade verificadas ter-se-ão devido unicamente à capacidade dos compostos em inibir cada uma das isoformas das COX, o que valida as conclusões expostas no parágrafo anterior. Um argumento a favor desta observação é o facto de cada uma das hexilamidas cumprir os quatro requisitos da regra de Lipinski: ter menos de 5 grupos doadores e menos de 10 grupos aceptadores de ligações de hidrogénio, apresentar log P estimado inferior a 5 e ter uma massa molecular inferior a 500 Da.³⁷ Ainda assim, o log P deveria ser confirmado experimentalmente, já que há sempre a possibilidade de não corresponder ao valor previsto.¹³

6. CONCLUSÕES

O trabalho laboratorial descrito na presente monografia resultou na obtenção de três hexilamidas de ácidos cinâmicos diferentes. O método de síntese selecionado revelou-se exequível e fiável para as reações levadas a cabo, na medida em que os compostos apresentaram um elevado grau de pureza após serem submetidos a técnicas de purificação convencionais em Química de síntese. Tal pureza foi evidenciada pelos TLC efetuados, pelos intervalos de fusão medidos e pelos espetros de RMN, os quais não apresentaram sinais inesperados. Também os rendimentos das reações estiveram de acordo com os verificados anteriormente para o mesmo tipo de compostos.³⁵

Por sua vez, a síntese que havia sido proposta para a obtenção de um composto do tipo hexilamida com dois grupos cinamoilo não chegou a ser completada, tendo ficado evidente que o segundo dos três passos previstos – a remoção do grupo BOC – apresentou um rendimento muito baixo. Apesar de o composto que se tentou sintetizar provavelmente não ter atividade, uma vez que a hexilamida simples do ácido utilizado (3,4-(metilendioxi)cinâmico) não revelou atividade inibitória das COX, a opção por esse ácido cinâmico teve em conta o facto de não apresentar grupos hidroxilo (os quais são reativos), o que teoricamente iria facilitar a obtenção do produto pretendido. Poderá ser feito um novo esforço no sentido de obter e quantificar a atividade de um composto deste tipo, mas deve

ser tido em conta se o método de síntese adotado será o mais adequado ou se poderá ser melhorado.

Relativamente à atividade evidenciada pelas hexilamidas, o reduzido número destas restringiu as considerações que puderam ser feitas sobre as relações estrutura-atividade, mas deu para perceber que a presença de um grupo hidroxilo no carbono 3 do anel aromático parece dar um contributo decisivo para dotar de atividade uma hexilamida de um ácido cinâmico, enquanto a presença de grupos metoxilo ou metilenodioxi nos carbonos 3 e 4, por si só, não confere atividade ao composto. A importância atribuída à função hidroxilo está na mesma linha dos estudos anteriores sobre atividade antioxidante e antitumoral deste tipo de compostos.^{34,35} A única hexilamida obtida que manifestou atividade, a do ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico (ou isoferúlico), mostrou ser ativa na inibição tanto da COX-I como da COX-2, com maior ponderação da primeira. Assim, a expectativa de obter inibidores com maior seletividade para a COX-2, devido à maior relevância desta em fenómenos de inflamação, não foi cumprida para estes três compostos. Porém, o projeto de investigação em que o presente trabalho se inseriu contemplou a síntese de outras hexilamidas de ácidos cinâmicos, algumas das quais revelaram uma atividade inibitória interessante em termos de seletividade. A reunião dos dados obtidos no decurso de todo o projeto está a ser compilada num artigo que se encontra em fase final de redação, com o objetivo de ser divulgado numa publicação científica da especialidade.

BIBLIOGRAFIA

1. SMITH, W. L., URADE, Y., JAKOBSSON, P. J. – **Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis.** Chem. Rev. 111, 10 (2011) 5821-5865.
2. SMITH, W. L., DEWITT, D. L., GARAVITO, R. M. – **Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology.** Annu. Rev. Biochem. 69 (2000) 145-182.
3. FITZPATRICK, F. A. – **Cyclooxygenase enzymes: regulation and function.** Curr. Pharm. Des. 10, 6 (2004) 577-588.
4. ROUZER, C. A., MARNETT, L. J. – **Cyclooxygenases: structural and functional insights.** J. Lipid Res. 50 (2009) S29-S34.
5. TEIXEIRA, A. A. – **Analgésicos, antipiréticos e anti-inflamatórios não esteroides. Antigotosos.** In: GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P. S. Terapia medicamentosa e suas bases farmacológicas: Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. Porto: Porto Editora, 2014. ISBN: 978-972-0-01794-9, p. 207-222.
6. FERREIRA, S. H., MONCADA, S., VANE, J. R. – **Indomethacin and Aspirin abolish Prostaglandin Release from the Spleen.** Nat. New Biol. 231, 25 (1971) 237-239.
7. MORITA, I., SCHINDLER, M., REGIER, M. K., OTTO, J. C., HORI, T., DEWITT, D. L., SMITH, W. L. – **Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2.** J. Biol. Chem. 270, 18 (1995) 10902-10908.
8. BLOBAUM, A. L., MARNETT, L. J. – **Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition.** J. Med. Chem. 50, 7 (2007) 1425-1441.
9. GARAVITO, R. M., MULICHAK, A. M. – **The Structure of Mammalian Cyclooxygenases.** Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 32 (2003) 183-206.
10. KULMACZ, R. J., VAN DER DONK, W. A., TSAI, A. L. – **Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2.** Prog. Lipid Res. 42, 5 (2003) 377-404.
11. ROWLINSON, S. W., CREWS, B. C., LANZO, C. A., MARNETT, L. J. – **The Binding of Arachidonic Acid in the Cyclooxygenase Active Site of Mouse Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2 (COX-2).** J. Biol. Chem. 274, 33 (1999) 23305-23310.
12. VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. – **Organic Chemistry: Structure and Function.** 7^a Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2014. ISBN 978-1-4641-2027-5.
13. SILVERMAN, R. B.; HOLLADAY, M. W. – **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action.** 3^a Ed. San Diego: Academic Press, 2014. ISBN 978-0-12-382030-3.
14. KIRKBY, N. S., CHAN, M. V., ZAISS, A. K., GARCIA-VAZ, E., JIAO, J., BERGLUND, L. M., VERDU, E. F., AHMETAJ-SHALA, B., WALLACE, J. L., HERSCHMAN, H. R., GOMEZ, M. F.,

- MITCHELL, J. A. – **Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: Role of NF- κ B and NFAT transcriptional pathways.** Proc. Natl. Acad. Sci. 113, 2 (2016) 434-439.
15. WALLACE, J. L. – **Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself?** Physiol. Rev. 88, 4 (2008) 1547-1565.
16. CANNON, C. P., CANNON, P. J. – **COX-2 Inhibitors and Cardiovascular Risk.** Science. 336, 6087 (2012) 1386-1387.
17. MILLER, S. B. – **Prostaglandins in Health and Disease: An Overview.** Semin. Arthritis Rheum. 36, 1 (2006) 37-49.
18. RICCIOTTI, E., FITZGERALD, G. A. – **Prostaglandins and inflammation.** Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 31, 5 (2011) 986-1000.
19. MCADAM, B. F., MARDINI, I. A., HABIB, A., BURKE, A., LAWSON, J. A., KAPOOR, S., FITZGERALD, G. A. – **Effect of regulated expression of human cyclooxygenase isoforms on eicosanoid and isoeicosanoid production in inflammation.** J. Clin. Invest. 105, 10 (2000) 1473-1482.
20. OWEN, J. A.; PUNT, J.; STRANFORD, S. A; JONES, P. P. – **Kuby Immunology.** 7^a Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2013. ISBN 978-14292-1919-8.
21. JOO, M., SADIKOT, R. T. – **PGD synthase and PGD₂ in immune response.** Mediators Inflamm. 2012 (2012) Article ID 503128.
22. FUNK, C. D. – **Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology.** Science. 294, 5548 (2001) 1871-1875.
23. PORTUGAL. INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP / Ministério da Saúde. **Prontuário Terapêutico - II.** [S.l.]: INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, IP / Ministério da Saúde, 2012. ISBN 978-989-8369-11-6.
24. RANG, H. P.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. – **Rang & Dale's Pharmacology.** 8^a Ed. London: Elsevier Churchill Livingstone, 2016. ISBN 978-0-7020-5362-7.
25. MACEDO, T. R. A. – **Eicosanoides: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros compostos.** In: GUIMARÃES, S.; MOURA, D.; SILVA, P. S. Terapia medicamentosa e suas bases farmacológicas: Manual de Farmacologia e Farmacoterapia. Porto: Porto Editora, 2014. ISBN: 978-972-0-01794-9, p. 312-321.
26. ANTMAN, E. M., BENNETT, J. S., DAUGHERTY, A., FURBERG, C., ROBERTS, H., TAUBERT, K. A. – **Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: An update for clinicians: A scientific statement from the American Heart Association.**

Circulation. 115, 12 (2007) 1634-1642.

27. YU, Y., RICCIOTTI, E., SCALIA, R., TANG, S. Y., GRANT, G., YU, Z., LANDEBERG, G., CRICHTON, I., WU, W., PURÉ, E., FUNK, C. D., FITZGERALD, G. A. – **Vascular COX-2 Modulates Blood Pressure and Thrombosis in Mice**. *Sci. Transl. Med.* 4, 132 (2012) 132ra54.

28. FANELLI, A., GHISI, D., APRILE, P. L., LAPI, F. – **Cardiovascular and cerebrovascular risk with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase 2 inhibitors: latest evidence and clinical implications**. *Ther. Adv. Drug Saf.* 8, 6 (2017) 173-182.

29. PRUSAKIEWICZ, J. J., DUGGAN, K. C., ROUZER, C. A., MARNETT, L. J. – **Differential sensitivity and mechanism of inhibition of COX-2 oxygenation of arachidonic acid and 2-arachidonoylglycerol by ibuprofen and mefenamic acid**. *Biochemistry.* 48, 31 (2009) 7353-7355.

30. TOSCO, P., LAZZARATO, L. – **Mechanistic insights into cyclooxygenase irreversible inactivation by aspirin**. *ChemMedChem.* 4, 6 (2009) 939-945.

31. TÓTH, L., MUSZBEK, L., KOMÁROMI, I. – **Mechanism of the irreversible inhibition of human cyclooxygenase-I by aspirin as predicted by QM/MM calculations**. *J. Mol. Graph. Model.* 40 (2013) 99-109.

32. VIEGAS, A., MANSO, J., CORVO, M. C., MARQUES, M. M. B., CABRITA, E. J. – **Binding of ibuprofen, ketorolac, and diclofenac to COX-I and COX-2 studied by saturation transfer difference NMR**. *J. Med. Chem.* 54, 24 (2011) 8555-8562.

33. GARBE, D. – **Cinnamic Acid**. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag Gmb, 2012. ISBN 9783527329830, volume 9, p. 193-196.

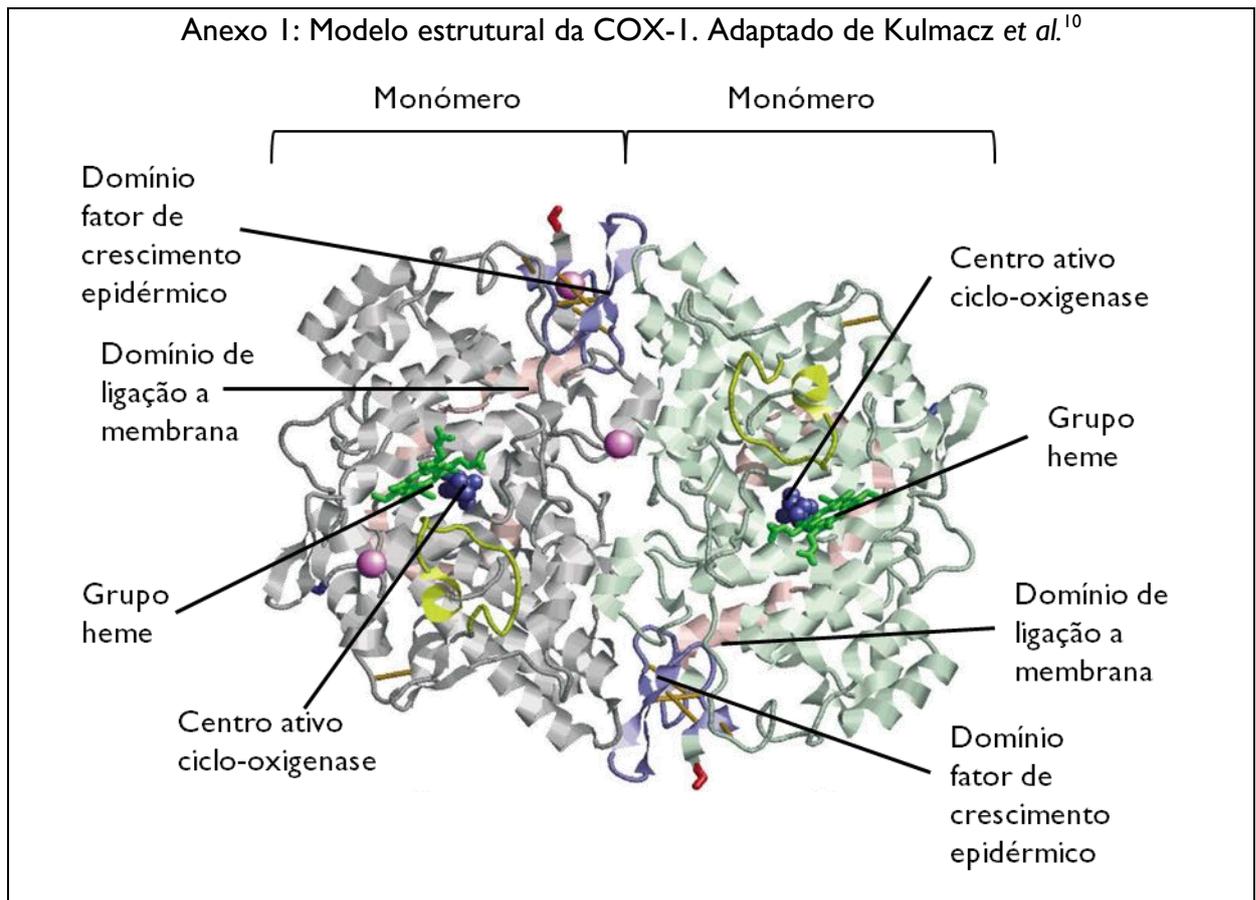
34. ROLEIRA, F. M. F., SIQUET, C., ORR, E., GARRIDO, E. M., GARRIDO, J., MILHAZES, N., PODDA, G., PAIVA-MARTINS, F., REIS, S., CARVALHO, R. A., SILVA, E. J. T., BORGES, F. – **Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties**. *Bioorganic Med. Chem.* 18, 16 (2010) 5816-5825.

35. TAVARES-DA-SILVA, E. J., VARELA, C. L., PIRES, A. S., ENCARNAÇÃO, J. C., ABRANTES, A. M., BOTELHO, M. F., CARVALHO, R. A., PROENÇA, C., FREITAS, M., FERNANDES, E., ROLEIRA, F. M. F. – **Combined dual effect of modulation of human neutrophils' oxidative burst and inhibition of colon cancer cells proliferation by hydroxycinnamic acid derivatives**. *Bioorganic Med. Chem.* 24, 16 (2016) 3556-3564.

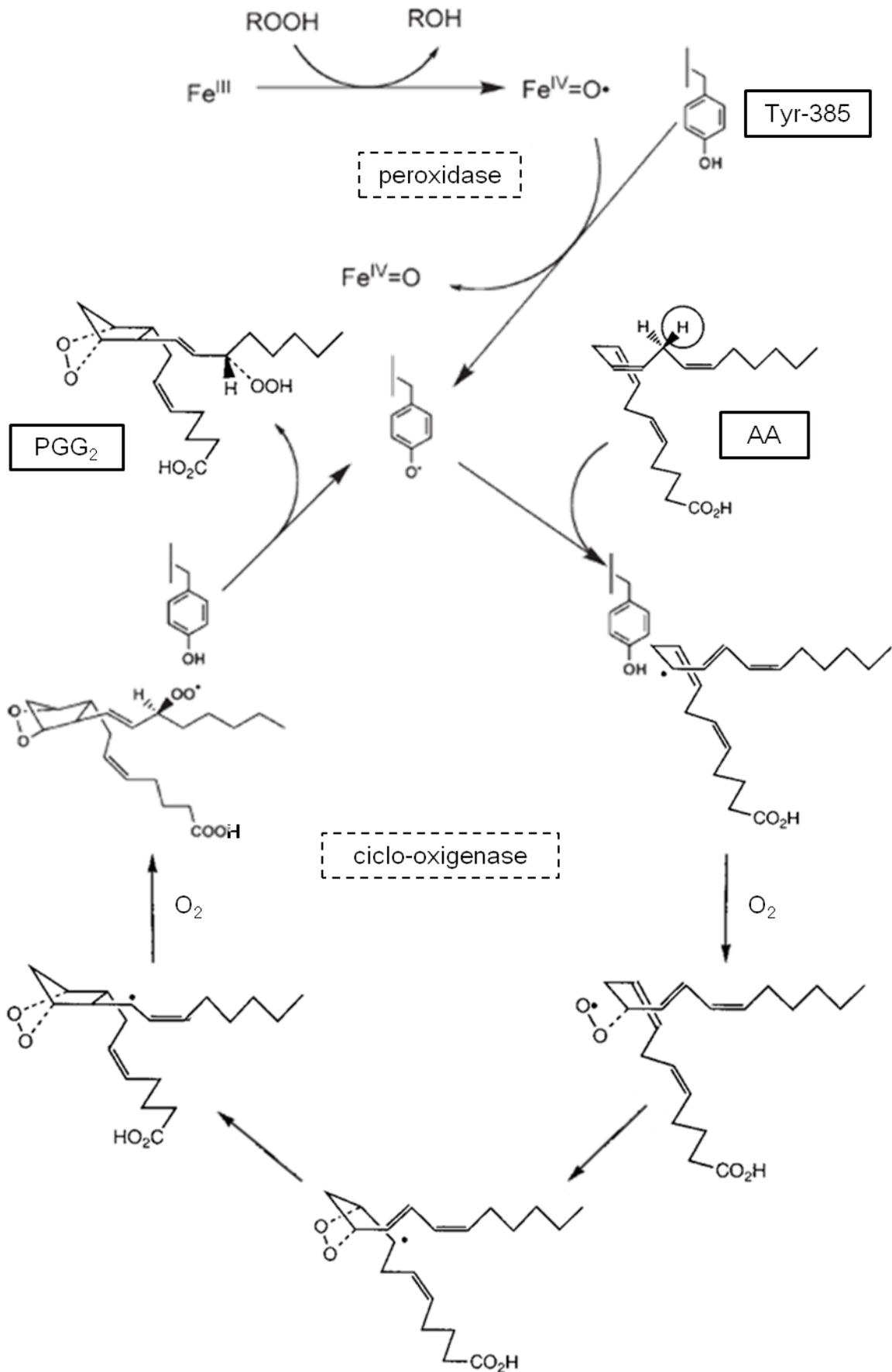
36. SILVA, T., BORGES, F., EDRAKI, N., ALIZADEH, M., MIRI, R., SASO, L., FIRUZI, O. – **Hydroxycinnamic acid as a novel scaffold for the development of cyclooxygenase-2 inhibitors**. *RSC Adv.* 5, 72 (2015) 58902-58911.

37. LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., FEENEY, P. J. – **Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings.** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 23, 1-3 (1997) 3-25.
38. RAJAN, P., VEDERNIKOVA, I., COS, P., BERGHE, D. V., AUGUSTYNS, K., HAEMERS, A. – **Synthesis and evaluation of caffeic acid amides as antioxidants.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11, 2 (2001) 215-217.
39. MONTALBETTI, C. A. G. N., FALQUE, V. – **Amide bond formation and peptide coupling.** *Tetrahedron.* 61, 46 (2005) 10827-10852.
40. VALEUR, E., BRADLEY, M. – **Amide bond formation: Beyond the myth of coupling reagents.** *Chem. Soc. Rev.* 38, 2 (2009) 606-631.
41. SHENDAGE, D. M., FRÖHLICH, R., HAUFE, G. – **Highly efficient stereoconservative amidation and deamidation of α -amino acids.** *Org. Lett.* 6, 21 (2004) 3675-3678.
42. YOUNG, J. M., PANAH, S., SATCHAWATCHARAPHONG, C., CHEUNG, P. S. – **Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production.** *Inflamm. Res.* 45, 5 (1996) 246-253.
43. LAUFER, S., GREIM, C., LUIK, S., AYOUB, S. S., DEHNER, F. – **Human whole blood assay for rapid and routine testing of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on cyclo-oxygenase-2 activity.** *Inflammopharmacology.* 16, 4 (2008) 155-161.
44. BLAIN, H., BOILEAU, C., LAPICQUE, F., NÉDÉLEC, E., LOEUILLE, D., GUILLAUME, C., GAUCHER, A., JEANDEL, C., NETTER, P., JOUZEAU, J. Y. – **Limitation of the in vitro whole blood assay for predicting the COX selectivity of NSAIDs in clinical use.** *Br. J. Clin. Pharmacol.* 53, 3 (2002) 255-265.
45. KNIGHTS, K. M., MANGONI, A. A., MINERS, J. O. – **Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity.** *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* 3, 6 (2010) 769-776.

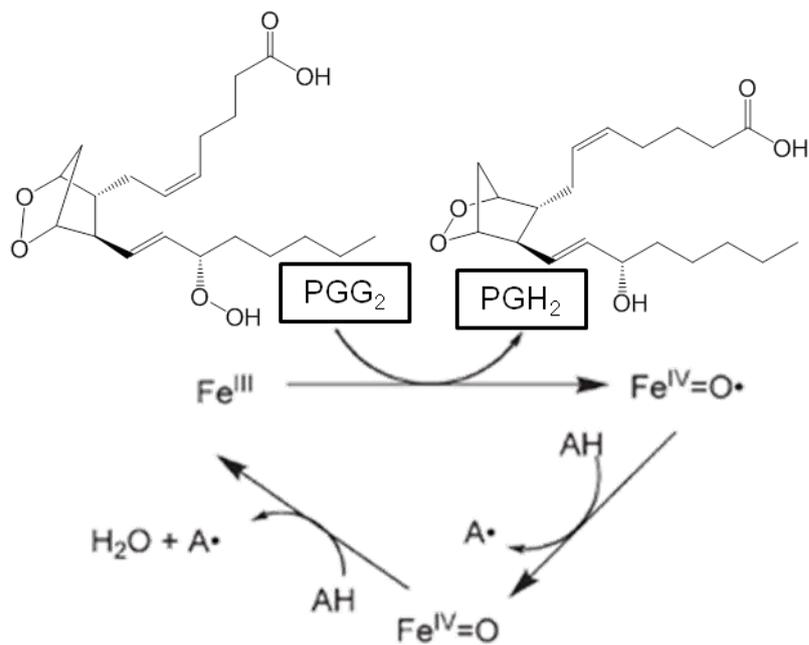
ANEXOS



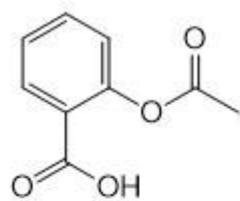
Anexo 2: Mecanismo de conversão de AA em PGG₂ pelas COX. Adaptado de Rouzer et al.⁴ e Rowlinson et al.¹¹



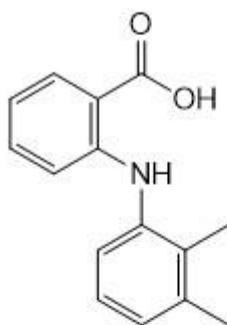
Anexo 3: Mecanismo de conversão de PGG₂ em PGH₂ e regeneração do heme férrico no centro ativo peroxidase das COX. Adaptado de Rouzer *et al.* ⁴



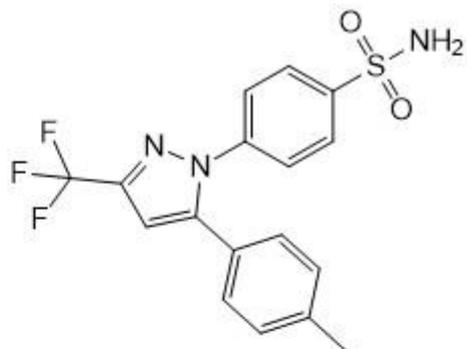
Anexo 4: Estruturas dos AINEs (de primeira geração e coxibs) referidos no capítulo 2.



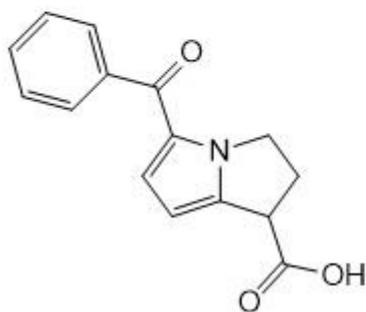
ácido acetilsalicílico



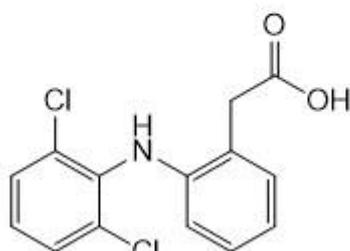
ácido mefenâmico



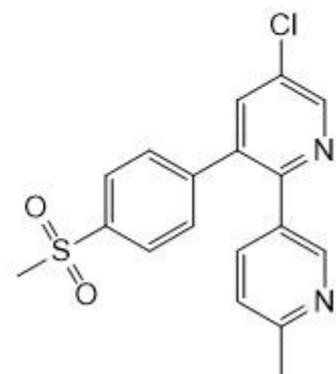
celecoxib



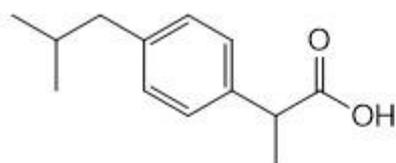
cetorolac



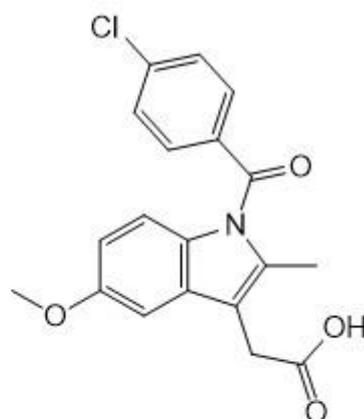
diclofenac



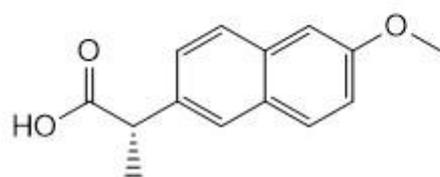
etoricoxib



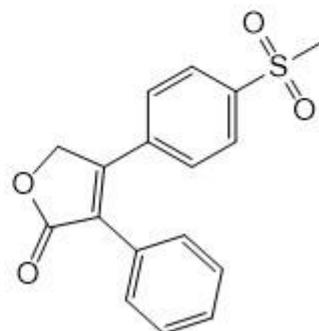
ibuprofeno



indometacina

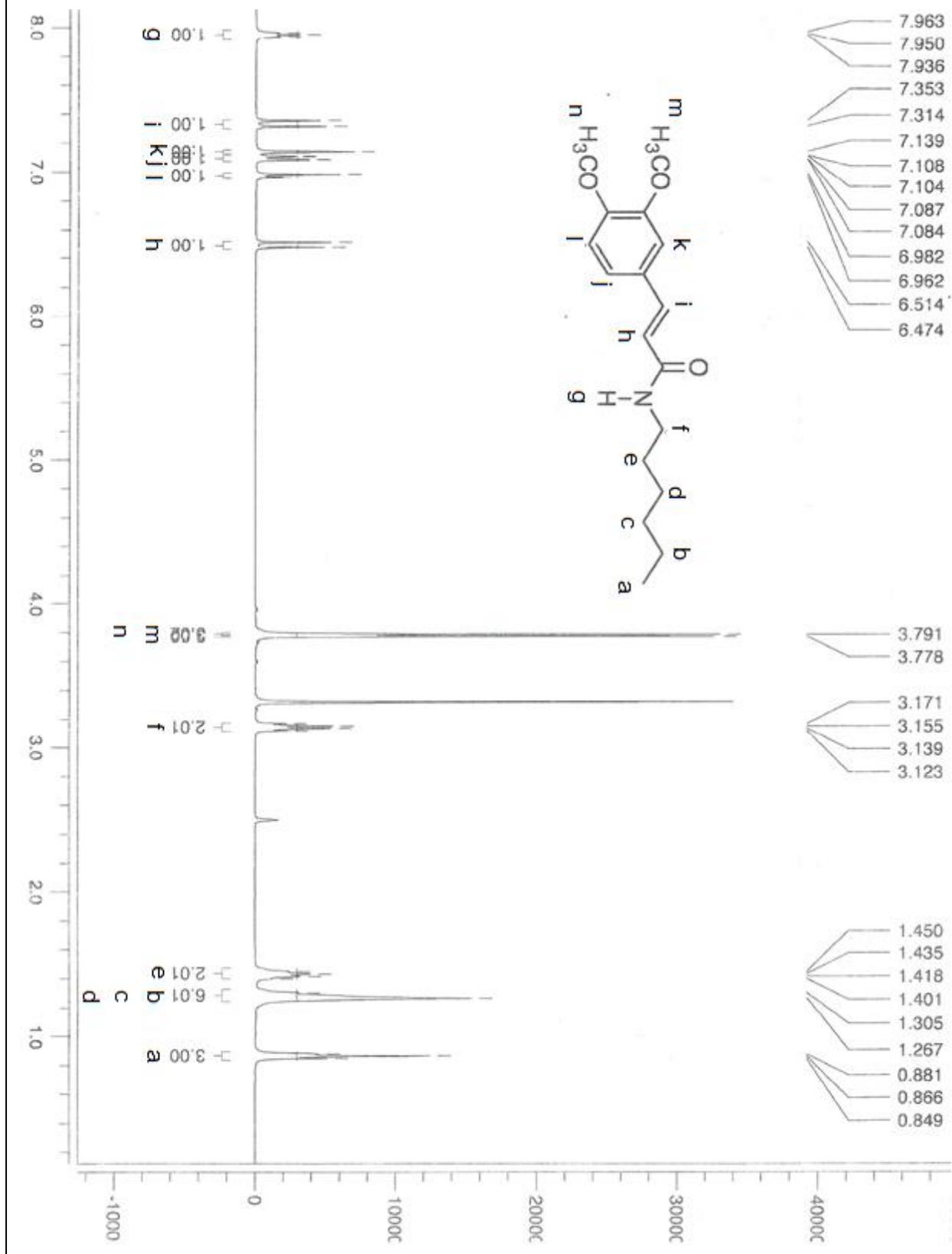


naproxeno

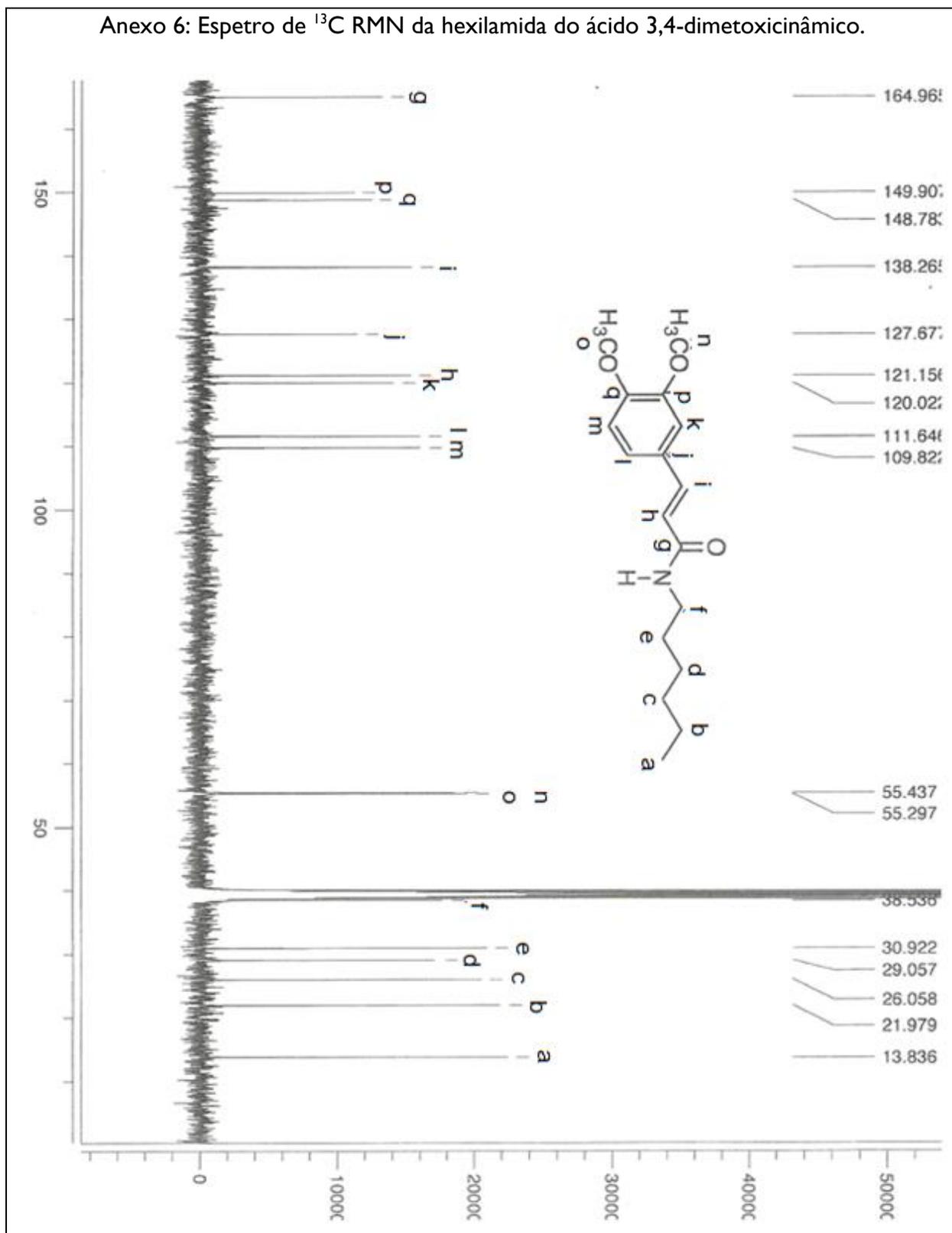


rofecoxib

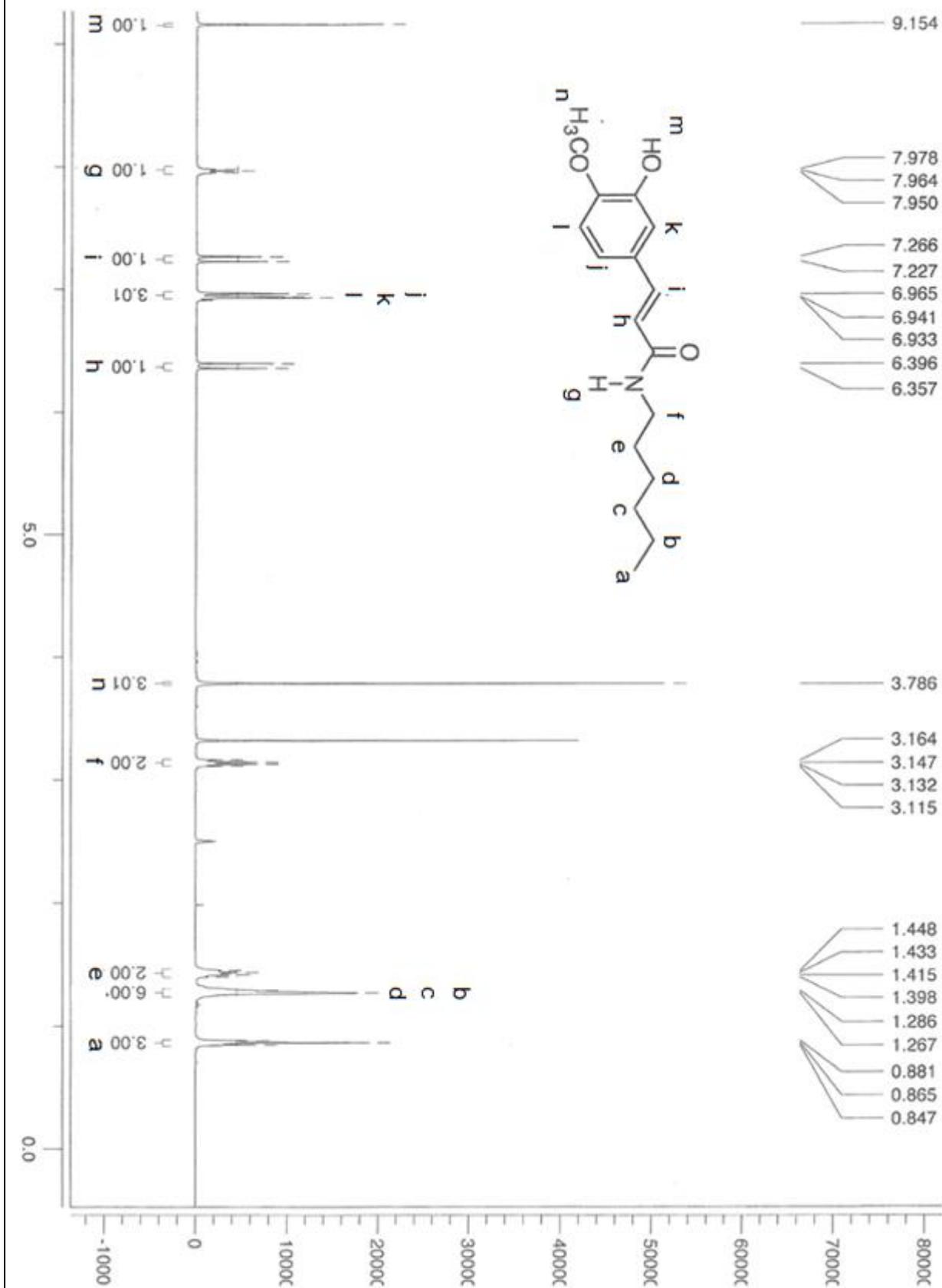
Anexo 5: Espectro de ¹H RMN da hexilamida do ácido 3,4-dimetoxicinâmico.



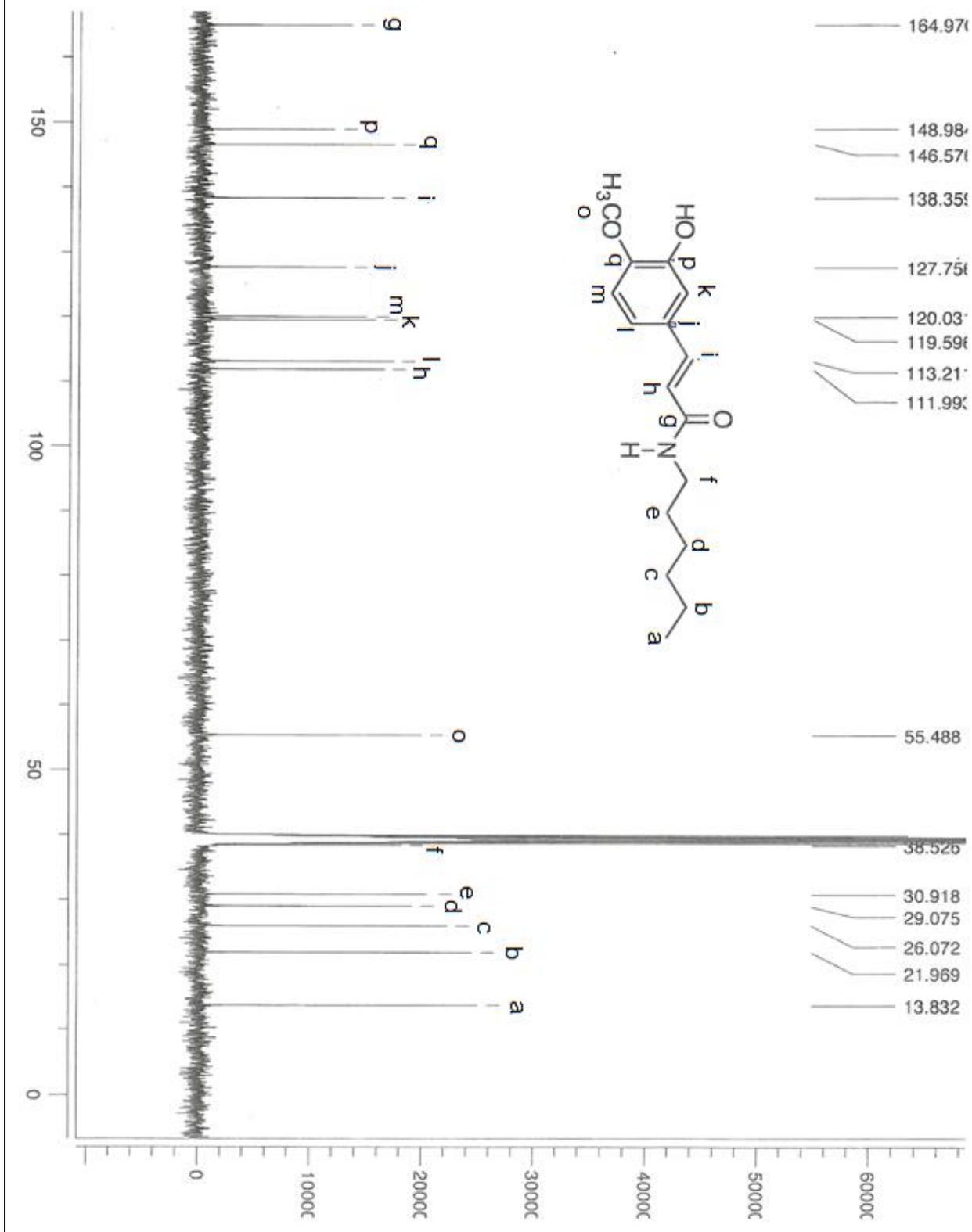
Anexo 6: Espectro de ^{13}C RMN da hexilamida do ácido 3,4-dimetoxicinâmico.



Anexo 7: Espectro de ^1H RMN da hexilamida do ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico.



Anexo 8: Espectro de ^{13}C RMN da hexilamida do ácido 3-hidroxi-4-metoxicinâmico.



Relatório de estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Estádio

ABREVIATURAS

DCI	denominação comum internacional
DCV	doença cardiovascular
LDL	lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	medicamento não sujeito a receita médica
MSRM	medicamento sujeito a receita médica
PCHC	produto cosmético e de higiene corporal
SWOT	pontos fortes, pontos fracos, oportunidades, ameaças (<i>strengths, weaknesses, opportunities, threats</i>)

I. INTRODUÇÃO

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) lecionado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra dita que a realização de um estágio curricular em Farmácia Comunitária no quinto ano é condição *sine qua non* para a conclusão do curso. De facto, a relevância desta área no setor farmacêutico é inegável, já que a maioria dos farmacêuticos em Portugal exerce nela a sua profissão.¹ Por outro lado, o papel intrínseco da Farmácia Comunitária na promoção da saúde da população é fundamental, por garantir em grande parte o acesso dos cidadãos aos medicamentos, assegurando ainda a prestação de cuidados de saúde em vertentes que se têm vindo a diversificar cada vez mais.² Assim, facilmente se percebe a importância deste estágio como primeiro contacto com o exercício da profissão farmacêutica.

O presente relatório incide sobre o estágio curricular em Farmácia Comunitária que realizei entre janeiro e maio de 2018 na Farmácia Estádio, sob a orientação da Dra. Ana Isabel Rebelo.

2. ANÁLISE SWOT

A análise da minha experiência numa perspetiva abrangente, relacionando o estágio, a farmácia e a minha formação académica, será realizada por uma análise SWOT, apresentando os pontos fortes e fracos intrínsecos ao ambiente de estágio e ao meu desempenho, bem como as oportunidades e ameaças externas ao mesmo que influenciaram a minha experiência (Anexo I).

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Localização da farmácia

A Farmácia Estádio localiza-se na Rua D. João III, em Coimbra, nas imediações do bairro da Solum. Insere-se numa zona da cidade fortemente urbanizada, com uma elevada densidade populacional. Os habitantes desta zona encontram assim nesta farmácia uma vantagem imediata – a localização. Além disso, esta área é abundante em infraestruturas de interesse público (escolas, espaços comerciais, bancos, instalações desportivas, etc.) e transportes coletivos, pelo que há um número considerável de pessoas provenientes de outras zonas da cidade, ou até de fora desta, que são utentes da farmácia. Outro aspeto

muito importante é a presença de um número elevado de clínicas e outras instituições privadas de saúde perto da farmácia: a título de exemplo, duas dessas clínicas estão situadas ao lado da farmácia e incluem nos seus quadros um conjunto de médicos considerados altamente reputados. Estas instituições atraem não só conimbricenses, mas também pessoas de outras regiões do país, que ali se deslocam para consultas médicas. Muitas destas pessoas deslocam-se à farmácia quando saem da respetiva clínica para aviarem receitas que eventualmente lhes tenham sido prescritas. Em suma, pode-se concluir que a localização da Farmácia Estádio lhe confere um número potencial de utentes muito elevado.

2.1.2. Perfil demográfico dos utentes

A distribuição etária e socioeconómica da população servida pela Farmácia Estádio é bastante interessante, permitindo ao estagiário contactar com uma grande diversidade de utentes. Em termos etários, a população que habita as áreas próximas da farmácia inclui muitas famílias com crianças e jovens, mas também um número relevante de idosos, resultando numa ampla distribuição etária dos utentes da farmácia. Por sua vez, uma parte considerável da população local insere-se num nível socioeconómico médio a médio-alto, possuindo um poder de compra acima da média: estas pessoas têm maior tendência a adquirir produtos para além de medicamentos, como PCHCs (produtos cosméticos e de higiene corporal) e suplementos alimentares, o que permite ao estagiário contactar com situações de aconselhamento mais diversas. Tal observação explica-se por estes utentes não estarem excessivamente preocupados com a sua despesa; no entanto, talvez por este motivo, tendem a ser menos recetivos à utilização de medicamentos genéricos. Outros utentes inserem-se num nível socioeconómico mais baixo, sobretudo idosos que, face aos seus recursos financeiros limitados, focam as suas despesas em medicamentos e acabam por ser mais favoráveis à aquisição de genéricos. Em suma, a distribuição socioeconómica dos utentes tende para um patamar médio-alto mas é também bastante ampla, refletindo-se nas vendas da farmácia, nos aconselhamentos e na experiência adquirida pelo estagiário.

2.1.3. Instalações

A Farmácia Estádio transferiu-se para a atual localização em 2006. Esta mudança produziu uma melhoria significativa na qualidade e na área das instalações,³ das quais destaco o espaço de atendimento, com linhas modernas e dimensões generosas que permitem a circulação de utentes e colaboradores, a exposição de uma ampla variedade de produtos e a existência de seis balcões de atendimento. Outros espaços importantes da farmácia incluem

uma zona de receção e armazenamento de medicamentos, três gabinetes de atendimento ao utente (cada um com valências específicas), um laboratório, um armazém, duas instalações sanitárias (uma para utentes e outra para colaboradores), gabinetes de contabilidade e de Direção Técnica e uma sala de reuniões. A meu ver, a modernidade e funcionalidade das instalações contribuem para a satisfação dos colaboradores, para a impressão positiva que os utentes têm da farmácia e para o bom funcionamento desta.

2.1.4. Sifarma 2000®

O *software* de gestão e atendimento utilizado na Farmácia Estádio é o Sifarma 2000®. Como estagiário, utilizei esta ferramenta de trabalho para atender utentes, dar entrada de encomendas, criar e atualizar fichas de utente, encomendar produtos, criar e regularizar devoluções, entre outras tarefas. Por se tratar do *software* utilizado por mais farmácias em Portugal,⁴ creio que a experiência que adquiri na sua utilização se revelará muito importante se alguma vez trabalhar em farmácia comunitária.

2.1.5. Aprendizagem das tarefas a desempenhar

Na Farmácia Estádio, os estagiários são gradualmente introduzidos às diferentes tarefas que se espera que eles desempenhem. Deste modo, o meu trabalho começou na zona de receção e armazenamento de medicamentos, onde aprendi a dar entrada de encomendas e a arrumar devidamente os vários tipos de produtos vendidos na farmácia. Na semana seguinte, foram-me transmitidos os conhecimentos necessários à realização de rastreios no gabinete de atendimento ao utente, tarefa que passei a desempenhar. No decorrer do primeiro mês, também aprendi a fazer encomendas e a tratar de devoluções. Ao fim de algumas semanas, comecei a observar o atendimento e rapidamente passei a fazê-lo. Esta evolução permite que o estagiário consolide a aprendizagem da realização de uma dada tarefa antes de iniciar a seguinte, tornando-se eventualmente capaz de desempenhar várias funções de forma autónoma conforme seja necessário.

2.1.6. Realização prévia de um estágio de verão

No verão de 2016, realizei um estágio extracurricular numa outra farmácia. Nesse período, tratei sobretudo da receção de encomendas e do armazenamento de produtos, e o *software* de gestão utilizado por essa farmácia era também o Sifarma 2000®. Deste modo, consegui desempenhar essas tarefas com relativa facilidade logo desde o início do estágio na

Farmácia Estádio. Outro aspeto positivo, relacionado com o facto de ter estagiado em farmácias diferentes, prende-se com o contacto com sistemas de organização e gestão distintos, que me permitiu compará-los e identificar aspetos positivos e negativos em cada um.

2.1.7. Rastreios

Os principais serviços farmacêuticos prestados na Farmácia Estádio dizem respeito aos rastreios que, por ordem decrescente de frequência, são os seguintes: pressão arterial, glicemia, colesterol total e triglicéridos. O facto de ter começado a realizar rastreios autonomamente ainda no início do estágio permitiu-me ter um primeiro contacto com os utentes da farmácia, incluindo alguns fidelizados, com os quais é importante que os colaboradores mantenham uma relação de confiança e proximidade. Pude também perceber que os rastreios são uma oportunidade para transmitir alguns ensinamentos ao utente, uma vez que a solicitação de um rastreio tem sempre por base uma preocupação com o estado de saúde. Desta forma, o contacto com os utentes neste âmbito permitiu-me desde logo aplicar conhecimentos adquiridos no MICF: com base na história clínica relevante, nos medicamentos tomados e na percepção que o utente tem do seu estado de saúde, procurei esclarecer as suas questões e prestar um aconselhamento adequado, sobretudo (mas não só) quando os parâmetros medidos apresentavam valores anormais. A transmissão de conhecimentos também é importante para desmistificar crenças ou receios não fundamentados que por vezes os utentes têm. Como exemplo, refira-se o caso de um utente que, num rastreio de colesterol total, manifestou o seu receio face à possibilidade de, no futuro, poder ter de iniciar a toma de estatinas. Este receio era devido à opinião de um médico, que aparecia regularmente na comunicação social, segundo o qual as estatinas eram pouco eficazes e aumentavam o risco de demência. Aproveitei a ocasião para explicar ao utente que as estatinas, para além de terem eficácia comprovada na diminuição do “mau colesterol” (LDL) e da incidência de doença cardiovascular (DCV),^{5,6} não têm evidência de aumento do risco de demência.^{7,8}

2.1.8. Integração na equipa e autonomia

A equipa da farmácia inclui quatro farmacêuticos (onde se inclui a Diretora Técnica, Dra. Ana Isabel Rebelo), uma técnica de farmácia e dois técnicos auxiliares de farmácia, para além de duas contabilistas e uma funcionária que se encarrega da limpeza das instalações. Com base na minha experiência, creio que a equipa tem gosto em acolher estagiários e o

meu relacionamento com os colaboradores foi sempre pautado não só pelo respeito e pela cordialidade, mas também pela simpatia. Encontrei sempre na equipa disponibilidade para me auxiliar perante as minhas dificuldades e empenho no sentido de tornar o estágio proveitoso e bem-sucedido. Neste âmbito, a Diretora Técnica teve uma reunião com os estagiários logo no início, onde abordou a evolução da Farmácia Estádio e do setor farmacêutico em Portugal nas últimas décadas, bem como os seus desafios na atualidade e no futuro próximo.

À medida que me fui tornando capaz de desempenhar várias tarefas na farmácia, pude verificar que a equipa me deu liberdade para trabalhar de forma autónoma, mas mantendo sempre a recetividade às minhas dúvidas e fazendo as advertências necessárias à correção do meu desempenho. A meu ver, este aspeto contribui para uma experiência de trabalho mais próxima da realidade e maximiza a aprendizagem por parte do estagiário.

É ainda de referir a inclusão dos estagiários nas reuniões de equipa, realizadas regularmente, onde eram expostos e debatidos assuntos relacionados com a organização e gestão da farmácia. Os estagiários foram também esclarecidos sobre a metodologia *Kaizen*, a qual é um complemento ao Sistema de Gestão da Qualidade implementado na farmácia que guia o funcionamento desta. O objetivo principal da metodologia é a melhoria contínua,³ tanto ao nível da organização e gestão, como no serviço prestado aos utentes. Neste âmbito, a farmácia definiu vários índices de desempenho que são quantificados mensalmente para cada colaborador, incluindo estagiários. Os resultados desses índices permitem ao estagiário avaliar o seu trabalho e ver em que aspetos é que ele pode melhorar.

2.1.9. Variedade dos conhecimentos aplicados no aconselhamento

Os conhecimentos adquiridos na minha formação académica permitiram-me aconselhar os utentes numa grande variedade de domínios, desde esclarecimentos sobre medicamentos sujeitos a receita médica (MSRMs) à indicação de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRMs) adequados para o tratamento de afeções simples (*vide* capítulo 3), não se restringindo a estes campos. Outro fator que contribuiu para a diversidade de solicitações com que me deparei foi o período em que decorreu o estágio, que refletiu a sazonalidade das necessidades dos utentes: para dar alguns exemplos, começou no inverno, quando eram prevalentes as constipações e os estados gripais, incluiu o início da primavera, associado a frequentes episódios alérgicos, e terminou em maio, altura em que a procura de protetores solares já era muito elevada.

2.1.10. Evolução do desempenho

Com o decorrer do estágio, à medida que fui ganhando mais confiança no desempenho das tarefas, que fui contactando mais com os utentes e que me familiarizei com os produtos disponibilizados na farmácia, adquiri novos conhecimentos e encontrei novas oportunidades para aplicar aqueles que já tinha presentes, o que se traduziu numa evolução contínua do meu desempenho até ao final do estágio. Posso mesmo afirmar que, se este se prolongasse por mais tempo, ainda teria mais margem para progredir.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Sinais de inexperiência no atendimento

Antes do estágio curricular, nunca tinha participado no atendimento ao utente, pelo que inevitavelmente demorei algum tempo até conseguir desempenhar essa tarefa com o mínimo de autonomia e confiança. A maior dificuldade prendeu-se com a aprendizagem da operacionalidade do Sifarma 2000[®] para efetuar vendas, sobretudo quando estas apresentavam algum grau de complexidade – por exemplo, quando várias receitas eram aviadas ao mesmo tempo, quando eram adquiridos MSRMs e outros tipos de produtos em simultâneo, quando era necessário introduzir um plano de participação especial, entre outras situações. Esta inaptidão refletia-se, por vezes, num tempo de atendimento mais longo do que seria desejável. Apercebi-me posteriormente de que, quando tal acontecia, havia o risco de dois aspetos de grande importância no atendimento – a comunicação e o aconselhamento – serem descurados, devido ao meu receio de aborrecer o utente ao prolongar ainda mais o atendimento.

Apesar destas dificuldades, contei sempre com o auxílio da equipa da farmácia para a sua resolução. Outra atenuante é o facto de os estagiários usarem uma bata de cor diferente da restante equipa, com a menção “Estagiário” visível, para transmitir aos utentes que quem os está a atender está em formação nesse sentido. Além disso, com o decorrer do estágio, fui interiorizando os procedimentos necessários à realização de vendas e tornei-me capaz de desempenhar essa tarefa com mais confiança e rapidez, passando a dar mais atenção às restantes componentes do atendimento.

2.2.2. Adaptação da comunicação ao utente

Ao longo do curso, termos como *princípio ativo* ou *posologia* passam a integrar o vocabulário científico básico do estudante de MICF. Porém, como rapidamente percebi no estágio, uma parte considerável da população desconhece esse tipo de conceitos, sobretudo se estivermos a falar de pessoas com baixo nível de escolaridade ou que não contactam regularmente com medicamentos. Outras situações relacionadas incluem utentes que não sabem identificar o laboratório de um dado medicamento que tomam ou que não sabem distinguir um medicamento original de um genérico. Quando comecei a atender utentes, a personalização do atendimento em função da literacia científica do utente era algo que por vezes não tinha em mente, o que inevitavelmente provocou barreiras de comunicação entre mim e alguns utentes. Mais uma vez, com o decorrer do estágio, tornei-me capaz de adaptar o meu discurso a cada tipo de utente e, no caso daqueles que tinham ficha na farmácia, ganhei o hábito de consultar o seu registo de vendas antes de fazer questões sobre medicação crónica que os pudessem confundir, e tais dificuldades acabaram por ser superadas.

2.2.3. Nomes comerciais de medicamentos

Outro aspeto relevante prende-se com a designação dos medicamentos por denominação comum internacional (DCI) e por nome comercial. Antes de iniciar o estágio, o estudante de MICF trabalha pouco com nomes comerciais de medicamentos; por sua vez, o utente, quando opta por um medicamento original, tende a referir-se a ele pelo nome comercial. Esta situação também cria dificuldades na comunicação porque, perante uma solicitação do utente relacionada com um medicamento específico mencionado pelo nome comercial, um estagiário que não o conheça não é capaz de responder imediatamente. Esta foi uma situação com que me deparei várias vezes; porém, com a prática, acabei por ir retendo cada vez mais nomes comerciais de medicamentos e esta dificuldade foi-se desvanecendo ao longo do estágio.

2.2.4. Nível de preparação em algumas áreas de aconselhamento

Embora seja irrealista pensar que o estagiário, quando chega à farmácia, já está na posse de todos os conhecimentos necessários para o desempenho das suas tarefas, não pude deixar de notar que muitas das situações em que senti dificuldade no aconselhamento ao utente se incluíam num de três domínios, explicitados nos parágrafos seguintes.

Dermofarmácia e Cosmética foi uma das áreas em que senti mais dificuldades no aconselhamento. Embora eu já detivesse conceitos teóricos relevantes neste campo, adquiridos na minha formação académica, senti muitas vezes que não os consegui aplicar na prática. Mais precisamente, quando confrontado com uma solicitação do utente neste âmbito, foram várias as ocasiões em que tive de pedir auxílio para aconselhar um determinado tipo de produto adequado ao utente, bem como para identificar produtos específicos com essas características. Verifiquei, por um lado, que a minha capacidade de indicação de produtos específicos evoluiu ao longo do tempo de trabalho na farmácia, pelo contacto com os mesmos e através do estudo de materiais informativos fornecidos pelas marcas de dermocosmética. Porém, a seleção das características do produto mais adequadas a cada utente é uma capacidade que, embora também tenha evoluído durante o estágio, poderia ter sido desenvolvida nas unidades curriculares adequadas do MICF, através, por exemplo, da análise e resolução de casos práticos.

A opinião anterior também se aplica no domínio das Preparações de Uso Veterinário. Neste caso, achei a formação recebida no MICF excessivamente teórica e pouco orientada para o aconselhamento, notando dificuldade em propor soluções concretas para as solicitações dos utentes. Embora admita que o desconhecimento dos produtos também tem aqui um grande peso e vai sendo solucionado com o tempo de trabalho, é do meu entender que a unidade curricular em causa do MICF poderia ter incluído a análise de casos práticos.

Por fim, um outro domínio de aconselhamento em que tive de pedir auxílio com muita frequência foi o das afeções oftalmológicas. Trata-se de uma temática que está muito pouco presente no MICF mas que, ao longo do meu estágio, esteve por trás de muitas solicitações de utentes. Com base nos sinais e sintomas, um caso até pode ser resolvido com um MNSRM à venda na farmácia, mas outras situações requerem que se encaminhe o utente para um oftalmologista, daí a importância do conhecimento deste campo.

2.2.5. Conhecimentos limitados em algumas áreas de farmacoterapia

Partindo do princípio que seria impossível abordar todos os grupos farmacoterapêuticos no MICF, senti ainda assim algumas lacunas nos meus conhecimentos relativos a determinados grupos que foram abordados no curso, nomeadamente sobre fármacos do sistema nervoso. Por oposição a estes, os conhecimentos sobre outros grupos lecionados foram sistematicamente consolidados ao longo do curso, em unidades curriculares que apostam na análise e resolução de casos práticos. Embora seja dever do estagiário rever os conteúdos lecionados no curso consoante as suas dificuldades, creio que

teria sido vantajosa no decurso da minha formação académica uma maior aposta no estudo de casos práticos envolvendo fármacos do sistema nervoso (e outros cuja abordagem pudesse ser mais aprofundada), desde a primeira vez que estes foram lecionados.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Participação em formações

Durante o estágio, tive a oportunidade de assistir a quatro formações decorridas fora da farmácia, que tiveram como temas: alergias e anti-histamínicos; suplementos alimentares; benefícios da contraceção hormonal na pele; e psoríase. A presença nestas formações permitiu-me não só adquirir novos conhecimentos de relevo para o atendimento, mas também consolidar conteúdos aprendidos no curso. Além destas, uma formação adicional sobre desparasitação animal foi lecionada por uma médica veterinária, dentro da farmácia. Destaco ainda os esclarecimentos prestados sobre gamas de produtos específicas por representantes de determinadas marcas, que se deslocavam à farmácia para o efeito.

2.3.2. Contacto com profissionais da área da saúde

Para além da comunicação com a equipa da farmácia, o estágio foi uma oportunidade para contactar com outros profissionais de saúde em contexto de trabalho, o que representa uma competência importante para um farmacêutico. Neste âmbito, contactei – sobretudo por via telefónica – com médicos (por exemplo, em situações em que os medicamentos prescritos estavam esgotados em todos os armazenistas, sendo necessário alterar a prescrição), enfermeiros (de várias instituições de cariz social que prestam cuidados de saúde, e que recorrem à farmácia para a aquisição de medicamentos) e também com outros farmacêuticos ou técnicos de farmácia, quando eram pedidas ou recebidas solicitações de outras farmácias.

2.3.3. Serviço de revisão da medicação

Este serviço era disponibilizado na Farmácia Estádio até há alguns anos atrás, de forma gratuita; porém, a crise que afetou o setor na última década tornou a sua prestação inviável. No entanto, a Diretora Técnica manifestou logo no início do estágio a sua vontade de aproveitar a presença dos estagiários para retomar este serviço nos mesmos moldes, o que se concretizou nas últimas semanas do estágio. Para o efeito, foram selecionados casais

de utentes (fidelizados) idosos e polimedicados, que foram convidados a ir à farmácia num horário que lhes fosse conveniente, trazendo consigo os seus medicamentos. Nas consultas de revisão da medicação, que decorreram sempre num dos gabinetes de atendimento, os utentes foram convidados a explicar como tomavam cada um dos seus medicamentos. Estas informações foram registadas numa tabela própria e analisadas no sentido de detetar eventuais erros de posologia, os quais foram seguidamente explicados aos utentes, com o objetivo de promover a adesão à terapêutica. Por fim, foram também aconselhadas aos utentes medidas não farmacológicas adaptadas ao seu estado de saúde. Apesar do número muito reduzido de utentes que marcaram consulta de revisão até ao final do meu estágio, aqueles fizeram questão de transmitir o seu agrado com o serviço que lhes foi prestado, o que me leva a concluir que a implementação deste serviço em larga escala nas farmácias seria altamente benéfica para a população.

2.4. Ameaças

2.4.1. Desconfiança face ao aconselhamento do estagiário

Embora tenha sido uma situação pouco frequente, não pude deixar de verificar que alguns utentes, ao serem atendidos por um estagiário, mostravam pouca confiança no seu aconselhamento. A meu ver, duas causas desta situação podem ser a perceção de que se está a ser atendido por um estagiário (devido ao uso de uma bata distinta, como já foi referido) e a aparente falta de experiência transmitida pelo estagiário (percetível, por exemplo, quando aquele não consegue responder de imediato à solicitação do utente). Para resolver situações deste tipo, recorri ao auxílio de colaboradores da farmácia, para que assegurassem ao utente a correção e pertinência do aconselhamento prestado.

2.4.2. Concorrência dos estabelecimentos de venda de MNSRMs

Verifiquei com apreensão que alguns utentes da farmácia recorrem a esta apenas para adquirir MSRMs, declarando a sua preferência pelos estabelecimentos de venda de MNSRMs localizados nas proximidades para comprar outros produtos (MNSRMs, PCHCs, suplementos alimentares, etc.) em virtude dos preços menores que aqueles praticam. A meu ver, para a farmácia comunitária se distinguir desses estabelecimentos e oferecer vantagens ao utente, o farmacêutico deve destacar-se pelo conhecimento que detém e pelo aconselhamento, propondo soluções que satisfaçam as necessidades dos utentes – o que

passa, por exemplo, pela seleção de produtos eficazes e com qualidade para o *stock* e pelo alargamento do conjunto de serviços prestados na farmácia.

2.4.3. Desvalorização dos conhecimentos do farmacêutico

Numa era em que a informação está cada vez mais acessível em diversas plataformas e em que as pessoas se mostram mais preocupadas com a sua saúde, os utentes procuram informar-se sobre esse assunto. No entanto, nem sempre usam os recursos mais adequados para esse efeito, uma vez que abundam as fontes de informação pouco fidedignas. Esta situação leva a que alguns utentes sobrestimem o seu verdadeiro nível de conhecimentos, o que, nalguns casos, faz com que deem pouco valor às informações dadas pelo farmacêutico. Pode mesmo acontecer que os utentes baseiem os seus hábitos em pressupostos errados, com potenciais implicações para a sua saúde. O papel do farmacêutico neste âmbito passa por se dotar de um vasto conjunto de conhecimentos cientificamente sustentados (para o qual é importante a sua formação contínua) e por estar atento às características e preocupações de cada utente, com vista a um aconselhamento relevante e personalizado.

2.4.4. Problemas informáticos

Ocasionalmente, o Sifarma 2000[®] sofre erros que não podem ser resolvidos ao nível da farmácia e que podem implicar, por exemplo, a necessidade de repetir uma venda ou a impossibilidade de aviar receitas eletrónicas. Esta situação é inconveniente para o utente e pode prejudicar a sua opinião acerca da farmácia, sobretudo se se tratar de um utente não fidelizado, embora a responsabilidade não seja da equipa da farmácia.

3. CASOS CLÍNICOS

3.1. Caso I – Constipações

Uma senhora solicita Antigrippine[®], alegando que ela, o marido e o filho de 13 anos estão constipados. Ela queixa-se de “garganta irritada”, não sentindo dor ao engolir, e “nariz entupido”. Refere que o filho apresenta as mesmas queixas. O marido, para além destes sintomas, acha que está a ficar com febre, porém, tem avaliado a temperatura corporal regularmente e esta não se tem afastado do valor normal. Perante este quadro, expliquei à utente que o Antigrippine[®] não era indicado naquela situação, porque o seu princípio ativo principal – paracetamol – se destina a tratar dores e febre,⁹ sintomas que nenhum membro

da família apresenta, e porque a sua eficácia no alívio da irritação da garganta seria questionável. Propus, em primeiro lugar, que adquirisse uma caixa de pastilhas Strepsils® (1,2 mg de álcool diclorobenzílico e 0,6 mg de amilmetacresol), para tratar a irritação na garganta, indicando que podia tomar uma pastilha a cada 2 ou 3 horas, consoante a necessidade, durante um máximo de 3 dias.¹⁰ Aconselhei ainda um *spray* nasal de água do mar hipertónica, para tratar a congestão, chamando a atenção para os cuidados na utilização (destacando a necessidade de limpar o aplicador) e recomendando a sua aplicação até 4 vezes por dia, durante um máximo de 5 dias. Por fim, recordei medidas não farmacológicas que a família deve adotar, como a ingestão de água em abundância e bebidas aquecidas, e disse à utente para regressar à farmácia no caso de os tratamentos propostos não levarem à melhoria dos sintomas.

3.2. Caso 2 – Dermatofitose

Um senhor dirige-se à farmácia, queixando-se de ter “pé-de-atleta”. Quando questionado acerca de sinais e sintomas específicos, refere que se trata de uma lesão entre dedos do pé com descamação da pele e fissuras, sentindo “comichão” nessa zona. Menciona ainda o facto de praticar uma modalidade desportiva de interior, o que poderia explicar a transmissão da infeção (pela utilização de balneários partilhados, por exemplo). Estas informações sugerem que se trata provavelmente de um caso de “pé-de-atleta” (tinea pedis). Aconselhei ao utente um creme de bifonazol (10 mg/g), um princípio ativo com ação antifúngica, a ser aplicado na área afetada uma vez por dia (de preferência à noite) durante 3 semanas.¹¹ Sugeri ainda a utilização de um antisséptico líquido cutâneo, como o Cyteal® (associação de clorocresol 3 mg/mL, cloro-hexidina 1 mg/mL e hexamidina 1 mg/mL),¹² a ser aplicado na área afetada, onde é deixado a atuar durante breves instantes, procedendo-se em seguida à lavagem abundante com água e secagem do pé, sendo que o creme antifúngico só deve ser aplicado quando o local da infeção já estiver seco. Por fim, recomendei medidas adicionais para evitar o agravamento ou o contágio da infeção, incluindo manter os pés secos e arejados e nunca andar descalço em espaços partilhados (incluindo chuveiros).

3.3. Caso 3 – Hipertensão arterial

Uma senhora pretende adquirir “os [seus] medicamentos para a tensão”, uma vez que os que tinha já acabaram, embora não tenha receita nem ficha de utente na farmácia. Dá a entender que, como já não os tomou no dia anterior, acabou por se “sentir mal” e ter tonturas. Apresenta as embalagens de três medicamentos diferentes: Lisinopril Aurovitas

20 mg; Nifedipina Generis 60 mg, comprimidos de liberação prolongada; e Adalat® CR 60 mg. Perguntei-lhe se costumava tomar todos esses medicamentos ao mesmo tempo, o que ela confirmou. Tratando-se de uma duplicação terapêutica, uma vez que o segundo medicamento é genérico do terceiro,¹³ expliquei-lhe essa situação para que ela daí em diante passasse a tomar apenas um ou o outro.

À medida que lhe fiz mais questões sobre a sua situação, a utente acabou por revelar que já não tomava nenhum dos medicamentos pedidos desde o ano anterior. Perante a ausência de receita, não lhe cedi os medicamentos e recomendei-lhe que consultasse o seu médico com a maior brevidade possível, uma vez que, se a hipertensão se tivesse agravado, poderia ser necessário fazer alterações à terapêutica instituída. Finalmente, propus à utente que medisse a tensão arterial na farmácia: as duas medições efetuadas revelaram pressões sistólicas de 207 e 213 mmHg. Estes valores extremamente elevados (hipertensão arterial de grau III) requerem tratamento imediato¹⁴ e determinaram o encaminhamento da utente para uma unidade de saúde.

4. CONCLUSÃO

Considero que o estágio foi uma experiência bastante enriquecedora, que contribuiu não só para a consolidação dos conhecimentos adquiridos no curso, mas também para a aprendizagem de novos conceitos. Pela observação da postura dos colaboradores da farmácia e pelas minhas próprias experiências, pude aperceber-me dos princípios pelos quais se deve pautar a atividade farmacêutica, como o profissionalismo, a competência e a preocupação com o bem-estar dos utentes, e testemunhei o importante papel da Farmácia Comunitária na saúde da população. Tenho noção de que, caso venha a trabalhar nesta área profissional, o meu desempenho ainda pode melhorar significativamente, mas percebo também que ser farmacêutico comunitário é um processo de adaptação e aprendizagem contínua, devido às inovações constantes no campo da saúde e à evolução das necessidades e do estado de saúde dos cidadãos.

BIBLIOGRAFIA

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Farmacêuticos em Números**. [S.l.]: [s.n.], [s.d.]. [Acedido a 13 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/numeros/>
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **A Farmácia Comunitária**. [S.l.]: [s.n.], [s.d.]. [Acedido a 13 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
3. FARMÁCIA ESTÁDIO – **Manual de Acolhimento e Integração**. 2016.
4. GLINTT – **Sifarma**. [S.l.]: [s.n.], 2016. [Acedido a 12 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
5. KARMALI, K. N., LLOYD-JONES, D. M., BERENDSEN, M. A., GOFF, D. C., SANGHAVI, D. M., BROWN, N. C., KORENOVSKA, L., HUFFMAN, M. D. – **Drugs for Primary Prevention of Atherosclerotic Cardiovascular Disease**. *JAMA Cardiol.* 1, 3 (2016) 341-349.
6. LU, Y., CHENG, Z., ZHAO, Y., CHANG, X., CHAN, C., BAI, Y., CHENG, N. – **Efficacy and safety of long-term treatment with statins for coronary heart disease: A Bayesian network meta-analysis**. *Atherosclerosis.* 254 (2016) 215-227.
7. OTT, B. R., DAIELLO, L. A., DAHABREH, I. J., SPRINGATE, B. A., BIXBY, K., MURALI, M., TRIKALINOS, T. A. – **Do Statins Impair Cognition? A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials**. *J. Gen. Intern. Med.* 30, 3 (2015) 348-358.
8. HERSI, M., IRVINE, B., GUPTA, P., GOMES, J., BIRKETT, N., KREWSKI, D. – **Risk factors associated with the onset and progression of Alzheimer’s disease: A systematic review of the evidence**. *Neurotoxicology.* 61 (2017) 143-187.
9. OMEGA PHARMA PORTUGUESA LDA. – **Resumo das características do medicamento Antigrippine trieffect, 500 mg + 5 mg comprimidos revestidos por película**. [S.l.]: [s.n.], 2017. [Acedido a 13 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=54361&tipo_doc=rcm
10. RECKITT BENCKISER HEALTHCARE LDA. – **Resumo das características do medicamento Strepsils Mel e Limão 1,2 mg + 0,6 mg Pastilhas**. [S.l.]: [s.n.], 2011. [Acedido a 13 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=45997&tipo_doc=rcm
11. BAYER PORTUGAL S. A. – **Resumo das características do medicamento**

Canespor 10 mg/g creme. [S.l.]: [s.n.], 2016. [Acedido a 13 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=5843&tipo_doc=rcm

12. PIERRE FABRE Dermo-Cosmétique Portugal, LDA. – **Resumo das características do medicamento Cyteal, 1 mg/ml + 1 mg/ml + 3 mg/ml Líquido Cutâneo.** [S.l.]: [s.n.], 2008. [Acedido a 5 de setembro de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=2286&tipo_doc=rcm

13. CENTROFARMA - INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS UNIPessoal LDA. – **Resumo das características do medicamento Adalat CR 60 mg comprimidos de libertação prolongada.** [S.l.]: [s.n.], 2016. [Acedido a 13 de maio de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=100&tipo_doc=rcm

14. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde – **Norma da Direção-Geral da Saúde, número 020/2011.** [S.l.]: [s.n.], 2011, 2013. [Acedido a 13 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://nocs.pt/definicao-classificacao-hipertensao-arterial/>

ANEXO

Anexo I: Tabela-resumo da análise SWOT relativa ao estágio em Farmácia Comunitária.

	Aspetos positivos	Aspetos negativos
Fatores intrínsecos ao estágio	<p><u>PONTOS FORTES</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Localização da farmácia• Perfil demográfico dos utentes• Instalações• Sifarma 2000®• Aprendizagem das tarefas a desempenhar• Realização prévia de um estágio de verão• Rastreios• Integração na equipa e autonomia• Variedade dos conhecimentos aplicados no aconselhamento• Evolução do desempenho	<p><u>PONTOS FRACOS</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Sinais de inexperiência no atendimento• Adaptação da comunicação ao utente• Nomes comerciais de medicamentos• Nível de preparação em algumas áreas de aconselhamento• Conhecimentos limitados em algumas áreas de farmacoterapia
Fatores exteriores ao desempenho	<p><u>OPORTUNIDADES</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Participação em formações• Contacto com profissionais da área da saúde• Serviço de revisão da medicação	<p><u>AMEAÇAS</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Desconfiança face ao aconselhamento do estagiário• Concorrência dos estabelecimentos de venda de MNSRMs• Desvalorização dos conhecimentos do farmacêutico• Problemas informáticos

Relatório de estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

ABREVIATURAS

DLS	<i>dynamic light scattering</i>
DOE	desenho experimental (<i>design of experiments</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
I&D	investigação e desenvolvimento
I&IT	Investigação e Inovação Tecnológica
ISO	Organização Internacional de Normalização (<i>International Organization for Standardization</i>)
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PCS	<i>photon correlation spectroscopy</i>
RH	Recursos Humanos
SWOT	pontos fortes, pontos fracos, oportunidades, ameaças (<i>strengths, weaknesses, opportunities, threats</i>)
USP	Farmacopeia Americana (<i>United States Pharmacopeia</i>)

I. INTRODUÇÃO

O presente relatório tem como objetivo descrever o meu estágio curricular em Indústria Farmacêutica, que decorreu no Setor de Investigação e Inovação Tecnológica (I&IT) da Bluepharma entre maio e julho de 2018, sob a orientação da Doutora Branca Silva e a tutoria do Doutor António Nunes.

A Bluepharma é uma indústria farmacêutica fundada em 2001, com sede em São Martinho do Bispo, nos arredores de Coimbra. Dedicar-se sobretudo ao desenvolvimento, produção e comercialização de medicamentos genéricos, pretendendo contribuir para o acesso da população aos cuidados de saúde, a melhoria da qualidade de vida dos cidadãos e o crescimento da economia nacional.¹ Caracteriza-se pela sua evolução assinalável nos últimos anos, refletida no número crescente de colaboradores, e por uma forte aposta na internacionalização, exportando 85% da sua produção.² A inovação e o investimento em atividades de investigação e desenvolvimento são igualmente prioridades da Bluepharma, que investe 25% do seu volume de negócios em I&D, o que traduz a importância atribuída a este setor.² Foi precisamente a existência de um departamento de investigação que despertou o meu interesse em estagiar nesta empresa.

2. PROJETO DE ESTÁGIO – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO PARA A DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA DE LIPOSSOMAS

Uma das mais recentes áreas de investigação do Setor de I&IT da Bluepharma são os injetáveis complexos, tendo sido iniciados projetos que têm como objetivo o desenvolvimento de formulações injetáveis constituídas por lipossomas. A tarefa que me foi atribuída para levar a cabo ao longo do estágio, integrada neste campo de investigação, consistiu em desenvolver e validar um método de medição do tamanho de partícula de lipossomas.

2.1. Noções básicas sobre lipossomas

Os lipossomas são vesículas nanométricas ou micrométricas³ delimitadas por uma ou mais bicamadas fosfolipídicas.^{4,5} Os fosfolípidos são moléculas anfipáticas,⁵ isto é, possuem uma porção polar e outra apolar, pelo que se dispõem de modo específico na bicamada quando os lipossomas se encontram num meio aquoso: as suas porções polares orientam-se

para os meios externo e interno (ambos aquosos) enquanto as porções apolares orientam-se umas para as outras, estabilizando a membrana.⁴ Deste modo, os lipossomas podem alojar uma grande variedade de fármacos, sejam eles hidrofílicos (ficando geralmente no compartimento interior) ou hidrofóbicos (ficando normalmente alojados na membrana).^{4,6} Estas características explicam que os lipossomas sejam opções interessantes para a administração de fármacos com problemas de solubilidade, estabilidade ou toxicidade.⁴ Exemplos destas vantagens incluem o aumento da solubilidade de um fármaco hidrofóbico num meio aquoso ou a proteção de um fármaco contra a ação de uma enzima que o poderia degradar.⁶ A composição dos lipossomas pode ainda ser alterada por forma a conferir vantagens específicas para a administração, distribuição, metabolização ou eliminação dos fármacos que transportam^{4,5} (Anexo I).

2.2. Relevância da determinação do tamanho de partícula em formulações lipossomais

O tamanho de partícula é uma propriedade muito importante dos lipossomas que integram uma formulação, uma vez que influencia não só o seu perfil farmacocinético,^{7,8} mas também a capacidade de transporte⁸ e a libertação do fármaco contido.^{7,8} O tamanho de partícula especificado para uma formulação é resultado das condições de produção⁷ e deve ser replicado em todos os lotes fabricados,⁵ constituindo por isso um importante indicador de qualidade que reflete alterações que possam ocorrer no processo de produção.⁴ A estabilidade física dos lipossomas também depende do tamanho de partícula, sendo por isso recomendado que todos os estudos de estabilidade deste tipo de formulações contemplem também a medição desse parâmetro.⁵ Igualmente relevante é o conhecimento da distribuição dos tamanhos de partícula dos lipossomas de uma formulação, geralmente designada por polidispersão,⁴ que se pretende tão homogênea quanto possível e é também dependente das condições de produção.⁷

Na Bluepharma, os projetos de investigação já iniciados no âmbito dos injetáveis complexos têm como objetivo o desenvolvimento de medicamentos genéricos. Isto significa que, em cada projeto, pretende-se obter uma formulação bioequivalente a uma outra já existente no mercado (medicamento original), o que vai depender do seu perfil farmacocinético. Como tal, os lipossomas que serão formulados devem apresentar um tamanho de partícula e uma polidispersão idênticos aos do medicamento original, explicando assim a necessidade de se medirem esses parâmetros em todos os lotes produzidos no

decurso da investigação – e, conseqüentemente, a obrigação de validar o respetivo método de medição.

2.3. Fundamento teórico da medição do tamanho de partícula por DLS/PCS

A técnica mais usada na medição do tamanho de partícula de lipossomas é a *dynamic light scattering* (DLS),⁴ também chamada de *photon correlation spectroscopy* (PCS).⁹ O fundamento da técnica baseia-se em duas propriedades das partículas nanométricas e submicrométricas. Em primeiro lugar, exibem movimentos brownianos,⁴ que são deslocamentos aleatórios resultantes de colisões com moléculas do meio em que elas se encontram suspensas.⁹ Além disso, têm a capacidade de dispersar um feixe de luz que incida nelas,^{4,9} desviando-o para vários ângulos. Fazendo incidir um feixe luminoso sobre uma suspensão, a intensidade da radiação dispersa que alcança um detetor varia constantemente: como as partículas estão em constante movimento, o modo de dispersão dos fótons que constituem o feixe está também em permanente alteração.⁹ Um equipamento de DLS/PCS regista e processa as variações da intensidade luminosa detetada em função do tempo, elaborando uma função de auto-correlação.⁸ A partir desta função, é extraído um parâmetro que se relaciona matematicamente com o coeficiente de difusão das partículas, o qual traduz a rapidez dos seus movimentos.^{8,9} Por sua vez, este coeficiente relaciona-se com o diâmetro de uma partícula esférica por meio de uma expressão matemática⁸ que inclui parâmetros como a temperatura e a viscosidade do fluido dispersante da suspensão.⁹

As vantagens desta técnica incluem a sua rápida⁹ e fácil execução,⁴ a reduzida quantidade de amostra necessária,⁹ o amplo intervalo de tamanhos de partícula que podem ser medidos (entre 20 e 1000 nm, no mínimo)⁴ e, relativamente a lipossomas, permite que estes sejam medidos no produto final.⁴ Porém, é incapaz de distinguir partículas individuais e agregadas, o que pode provocar erros, e é muito sensível à presença de impurezas, mesmo em baixas quantidades.⁴ Deve ainda ser referido que a aplicação desta técnica implica que as partículas em análise sejam consideradas esféricas.⁹

2.4. Resumo do trabalho realizado

O meu trabalho começou com uma extensa pesquisa bibliográfica, tendo-me debruçado primeiro sobre a importância do tamanho de partícula enquanto propriedade dos lipossomas e os fundamentos da sua medição por DLS/PCS. Como o método a validar seria levado a cabo num equipamento de DLS/PCS existente no laboratório de I&D, procurei conhecer com detalhe as suas especificidades técnicas e os parâmetros que devem ser

definidos para a execução de uma análise, reconhecendo que alguns deles influenciam o resultado da medição. Nesta fase, a minha pesquisa passou a focar-se em normas e documentos regulamentares ou orientadores de entidades oficiais, como a USP (Farmacopeia Americana), a FDA (*Food and Drug Administration*) ou a ISO (Organização Internacional de Normalização), que tivessem aplicabilidade à execução da técnica de DLS/PCS e/ou à medição do tamanho de partícula de lipossomas. Registei e compilei informações relativas à seleção dos padrões a usar na validação do método, ao procedimento de preparação e análise de amostras e padrões e aos critérios de validação do método de análise, com base nos resultados obtidos.

Seguidamente, deu-se início ao trabalho laboratorial, o qual começou com um desenho experimental (DOE) que conduziu à realização de experiências para avaliar a influência dos parâmetros de análise no tamanho de partícula medido de um padrão (*vide* subcapítulo 3.3.3). Conjugando os resultados obtidos neste âmbito com as informações previamente recolhidas, foram definidas algumas configurações de parâmetros de análise com as quais foram finalmente realizados ensaios de validação, usando os padrões adequados (Anexo 2).

Por fim, o trabalho de pesquisa levado a cabo e os resultados do trabalho laboratorial foram apresentados e discutidos por mim num relatório interno e numa exposição oral perante a maioria dos colaboradores do Setor de I&IT.

3. ANÁLISE SWOT

A presente análise SWOT debruça-se sobre os pontos fortes e fracos que caracterizaram a minha experiência na Bluepharma, sendo também abordadas as oportunidades e ameaças que, embora não sendo dependentes do meu desempenho, foram observadas no decurso do estágio (Anexo 3).

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Acolhimento e integração na empresa

O meu acolhimento no Setor de I&IT ficou a cargo do tutor de estágio. A figura do tutor tem como objetivo promover a integração do estagiário no setor, para que este fique a conhecer os espaços relevantes para o seu trabalho e os colaboradores com quem irá contactar. Entretanto, fui incumbido de ler um conjunto de procedimentos operativos

normalizados relevantes para o trabalho em I&T e na Bluepharma em geral. Tive ainda uma reunião com o meu tutor e com a Diretora do Departamento de Investigação e Inovação (onde está inserido o Setor de I&T), a qual procurou conhecer a minha experiência profissional e as minhas expectativas, de modo a definir o meu projeto de estágio, tendo este me sido apresentado pela minha orientadora na segunda semana, juntamente com uma proposta de cronologia das tarefas a cumprir com vista à conclusão do projeto. Ficaram então reunidas as condições para o início do meu trabalho. A nível departamental, refira-se ainda a minha participação numa reunião trimestral de departamento, já na segunda metade do estágio, na qual se fez o ponto de situação dos projetos de investigação em curso.

A integração dos estagiários na empresa processa-se de modo idêntico aos restantes trabalhadores. A Bluepharma tem instituído um plano de formação para novos colaboradores que contempla ações de formação sobre temas como: evolução histórica da empresa; utilização responsável de recursos informáticos; segurança e saúde no trabalho; assuntos regulamentares; farmacovigilância; sistema de gestão de investigação, desenvolvimento e inovação; gestão de resíduos; entre outros. Importa ainda referir o esforço do Departamento de Recursos Humanos (RH) no sentido de promover uma cultura empresarial inclusiva e a satisfação dos trabalhadores, tendo também em mente os estagiários. Um exemplo ilustrativo foi a participação destes no evento anual de colaboradores da Bluepharma, que se baseia numa forte componente lúdica e social, promovendo o convívio entre pessoas de diferentes departamentos.

3.1.2. Condições de trabalho

Logo no primeiro dia, foi-me atribuído um computador portátil com acesso à internet, o qual conservei até ao fim do estágio. Usei-o sobretudo para efetuar a maior parte da minha pesquisa e para redigir documentos como protocolos laboratoriais e o relatório interno. O computador deu-me ainda acesso a utilidades da empresa como os serviços de correio eletrónico e mensagens instantâneas, que são os principais meios de comunicação entre colaboradores, e o repositório de ficheiros, que me permitiu partilhar o trabalho produzido com a minha orientadora. A Bluepharma forneceu também os equipamentos de proteção individual permanentes necessários ao trabalho laboratorial, nomeadamente bata e óculos.

3.1.3. Reuniões periódicas

Após ter sido estabelecido o projeto de estágio, passei a ter reuniões semanais com a minha orientadora, nas quais lhe ia transmitindo os progressos recentes do meu trabalho, para além de definirmos a estratégia de trabalho a seguir no futuro imediato e de debatermos questões que surgiam em consequência da pesquisa e do trabalho experimental. Na última reunião, fez-se uma retrospectiva do trabalho desenvolvido. O interesse demonstrado pela minha orientadora no acompanhamento do meu trabalho foi um fator decisivo para o sucesso do meu estágio.

3.1.4. Capacidade de pesquisa e espírito crítico

Ao longo do trabalho de pesquisa realizado, procurei sempre consultar o maior leque possível de fontes credíveis. Esta preocupação foi maior na pesquisa de normas e regulamentações de entidades oficiais aplicáveis à validação do método (*vide* subcapítulo 2.4). Posteriormente, sumariei as informações obtidas dessas fontes para analisar criticamente os resultados obtidos no trabalho experimental, o que me permitiu comparar procedimentos e extrair as conclusões relevantes para o projeto.

3.1.5. Apresentação do trabalho desenvolvido

Os colaboradores do Setor de I&IT demonstraram o seu agrado com a minha apresentação oral do trabalho desenvolvido no estágio, tendo destacado o meu domínio dos assuntos abordados, a exposição e análise dos resultados obtidos e as minhas sugestões para estratégias de trabalho a seguir no futuro.

3.1.6. Relevância do trabalho desenvolvido

A orientadora fez questão de me transmitir a importância do meu trabalho para os projetos de investigação em que ele se integrou, uma vez que só a validação de um método apropriado é que garante a qualidade analítica da determinação do tamanho de partícula de uma formação lipossomal. A ausência de validação revelar-se-ia um obstáculo no processo de I&D das formulações e, a longo prazo, impediria a sua aprovação por agências regulamentares.

3.1.7. Domínio da língua inglesa

Rapidamente percebi que os meus conhecimentos de inglês seriam altamente vantajosos para o estágio, uma vez que, para além de muitos documentos internos da Bluepharma serem redigidos neste idioma, era essa a língua de praticamente todas as fontes de informação que usei no meu trabalho. Por fim, tanto o relatório interno que elaborei como os diapositivos que acompanharam a minha apresentação oral tiveram de ser escritos em inglês.

3.1.8. Evolução do desempenho

Na minha opinião, as dificuldades com que me deparei nas primeiras semanas do estágio foram superadas no decurso do mesmo, o que se traduziu numa melhoria progressiva do meu desempenho. A título de exemplo, o facto de ter começado a encontrar fontes de informação de forma autónoma e de ter apostado na sistematização dos dados recolhidos tornou-me mais versado no tema do projeto e passei a ser capaz de propor estratégias de trabalho e protocolos a testar. Do mesmo modo, a minha adaptação ao laboratório também fez com que passasse a executar protocolos mais rapidamente e de forma autónoma.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1. Falta de conhecimentos específicos

Embora não tenha detetado lacunas no meu conhecimento que tenham prejudicado de forma relevante o meu desempenho, irei destacar dois pontos em que senti alguma falta de preparação. Quando me foi anunciado que o trabalho estaria relacionado com formulações lipossomais, apercebi-me que o meu conhecimento nessa área era muito básico: trata-se de um tema que é lecionado numa unidade curricular do MIFC em que senti dificuldades, o que me obrigou a rever os conteúdos lecionados nesse âmbito. Também me foram fornecidos no estágio recursos bibliográficos que me permitiram contornar esta limitação. Por outro lado, um assunto com que me deparei no decurso da minha pesquisa, já no final do estágio (pelo que o seu estudo foi pouco aprofundado), foi a utilização de testes estatísticos específicos para aceitar resultados de medições e para validar métodos. Creio que tais testes não foram lecionados nas unidades curriculares relacionadas do MIFC, pelo

que teria sido vantajosa uma maior aposta na aplicação prática da Estatística ao contexto das Ciências Farmacêuticas, incluindo em I&D, no decurso da minha formação académica.

3.2.2. Assimilação de regras estritas no trabalho laboratorial

Algumas das regras do trabalho em laboratório com que me deparei foram inéditas na minha experiência, pelo que demorei algum tempo a assimilá-las. O exemplo mais notório será provavelmente a eliminação de resíduos gerados no decurso do trabalho, os quais, dependendo da sua natureza, são tratados de forma diferente, começando pela sua colocação em recipientes distintos devidamente identificados. A principal dificuldade prendeu-se com a atribuição de determinados resíduos às respetivas categorias de tratamento, tendo esclarecido este tipo de dúvidas com os colaboradores que trabalhavam no laboratório. Uma outra regra que me teve de ser ocasionalmente recordada por eles foi o preenchimento do registo de utilização de cada aparelho após a conclusão de uma tarefa no mesmo, a qual deve ser especificada.

3.2.3. Registo de fontes de informação

Quando iniciei o trabalho de pesquisa, à medida que compilava as informações encontradas de uma forma ainda pouco sistematizada, esquecia-me por vezes de registar a fonte correspondente a cada dado, o que limitava a sua utilização posterior e me obrigou a repetir algumas partes da pesquisa. Com o decorrer do estágio, fui adquirindo hábitos de trabalho mais consistentes e deixei de notar este problema.

3.2.4. Capacidade de síntese de informação

Entre a fundamentação teórica do método, os dados obtidos de diversas *guidelines* sobre o desenvolvimento e a validação do mesmo e os resultados do trabalho laboratorial levado a cabo, encontrei-me perante uma enorme quantidade de informação a abordar na minha apresentação oral final. Face ao tempo previsto para a mesma, a minha primeira abordagem à sua preparação revelou-se desadequada, ultrapassando largamente a quantidade de informação pretendida. O auxílio da minha orientadora perante esta dificuldade foi essencial, tendo-me ajudado na síntese dos conteúdos a abordar e no estabelecimento de um plano de apresentação mais conciso e com uma ordem mais lógica.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Seleção dos estagiários por entrevista

Entre as empresas que acolhem estagiários da FFUC (Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra), a Bluepharma é provavelmente uma das poucas, senão a única, que seleciona estudantes com base no seu currículo e na realização de uma entrevista, que conta com a presença de um colaborador do Departamento de RH e de vários diretores de departamento. Tendo sido a minha primeira entrevista profissional, esta foi uma oportunidade preciosa para me aperceber de aspetos que devo corrigir quando me deparar com este tipo de situação no futuro.

3.3.2. Contacto com a indústria farmacêutica

Este estágio foi o meu primeiro contacto com a indústria farmacêutica, tendo-me apercebido que se trata de um domínio extremamente polivalente, por integrar I&D, produção, controlo de qualidade, assuntos regulamentares, desenvolvimento de negócio, farmacovigilância, entre outras áreas, constituindo por isso uma saída profissional muito interessante. No que à área de investigação diz respeito, o estágio permitiu-me detetar diferenças entre os contextos académico e industrial em que este tipo de trabalho decorre, em virtude da minha experiência prévia no primeiro.

3.3.3. Ferramentas e competências de trabalho em investigação

No decurso do estágio, contactei pela primeira vez com ferramentas informáticas de grande utilidade para o trabalho em investigação. Uma delas foi o *software* JMP[®], usado na otimização de métodos e processos por DOE, que tem como objetivo o estudo da influência das variáveis independentes de uma experiência sobre o desfecho desta, representado por uma variável dependente.¹⁰ Um método otimizado é aquele que produz o desfecho pretendido, traduzido por um dado valor. Por exemplo, no caso do DOE que realizei, a variável dependente era o tamanho de partícula medido de um padrão e o valor pretendido para ela era o tamanho de partícula tabelado para esse padrão (indicado pelo fabricante). Inserindo no *software* o conjunto das variáveis independentes associadas ao método (por exemplo, o ângulo de deteção da radiação dispersa, numa análise por DLS/PCS) e especificando os valores ou atributos que cada variável pode tomar, sejam eles qualitativos ou quantitativos (podendo neste caso ser discretos ou contínuos), o JMP[®] propõe um

conjunto de experiências a levar a cabo, especificando para cada uma os atributos que cada variável independente deve tomar. A execução das experiências propostas permite estudar todas essas variáveis em simultâneo, por oposição à abordagem tradicional destas situações em que se alterava uma variável de cada vez, obrigando a efetuar um número muito maior de experiências. Uma vez realizadas as experiências propostas e introduzidos os respetivos resultados no JMP[®], o *software* elabora modelos matemáticos que relacionam cada uma ou várias das variáveis independentes com o valor da variável dependente, permitindo avaliar o grau de correlação entre elas. Introduzindo o valor ou intervalo de valores pretendido para a variável dependente, o JMP[®] indica com base nos modelos elaborados quais os atributos que cada variável independente deverá tomar para que o método cumpra esse objetivo. O método otimizado será, portanto, aquele cujas variáveis independentes assumem os atributos recomendados para cada uma pelo *software*.

Outra ferramenta de grande relevo com que trabalhei pela primeira vez foi o Mendeley, um programa informático utilizado na gestão e organização de fontes bibliográficas, tendo-se revelado muito útil na redação do relatório final.

3.3.4. Acompanhamento do trabalho laboratorial

Em virtude de ter concluído as tarefas que me foram atribuídas alguns dias antes do final do estágio, fiquei então disponível para acompanhar o trabalho laboratorial levado a cabo por outros colaboradores no âmbito dos seus projetos de investigação. A título de exemplo, acompanhei procedimentos de fabrico e extrusão de lipossomas (um processo de redução do tamanho destas partículas que consiste na sua passagem por uma ou mais membranas de policarbonato⁴⁶), estudos de impurezas de princípios ativos com base na degradação forçada destes e análises quantitativas de solventes residuais em formulações por cromatografia gasosa, tendo-me sido transmitidos os principais fundamentos destas técnicas.

3.4. Ameaças

3.4.1. Escassez de *guidelines* sobre formulações lipossomais

Quando procurei normas e documentos orientadores de entidades oficiais que pudessem ter aplicabilidade no estudo do tamanho de partícula de formulações lipossomais, tive eventualmente de concluir que, com base nos recursos disponíveis e à data em que terminei a pesquisa, não havia nenhuma fonte desse tipo que abordasse de forma explícita e detalhada esse tema. É ainda de referir o facto de a Farmacopeia Europeia, na versão que me

foi disponibilizada, não conter qualquer capítulo ou monografia sobre formulações lipossomais. Deste modo, a pesquisa de fontes desta natureza teve de ser alargada a âmbitos mais gerais (nomeadamente documentos sobre DLS/PCS).

3.4.2. Implicações da duração do estágio

A duração do estágio na Bluepharma é condicionada pela janela de tempo que a FFUC concede para a realização de estágios curriculares. Com efeito, considerei que o meu estágio foi demasiado curto para poder conhecer com detalhe as várias vertentes do trabalho desenvolvido no Setor de I&IT. As tarefas que desempenhei no estágio limitaram-se quase exclusivamente ao projeto que levei ao cabo, sendo que uma razão pela qual o mesmo me foi atribuído foi precisamente o facto de ser previsivelmente exequível no tempo que eu ia ter disponível. Esta restrição das tarefas que desempenhei fez com que por vezes o meu trabalho fosse algo monótono, sobretudo nas primeiras semanas do estágio em que estive quase sempre a fazer pesquisa bibliográfica e compilação de informações, e limitou a diversidade do trabalho laboratorial que realizei e presenciei. Embora reconheça que tal seja impraticável nos moldes atuais, um estágio de maior duração poderia ter permitido que eu acompanhasse outros projetos de investigação, tanto no campo dos injetáveis complexos como noutros, e que eu contactasse mais com o trabalho laboratorial.

4. CONCLUSÃO

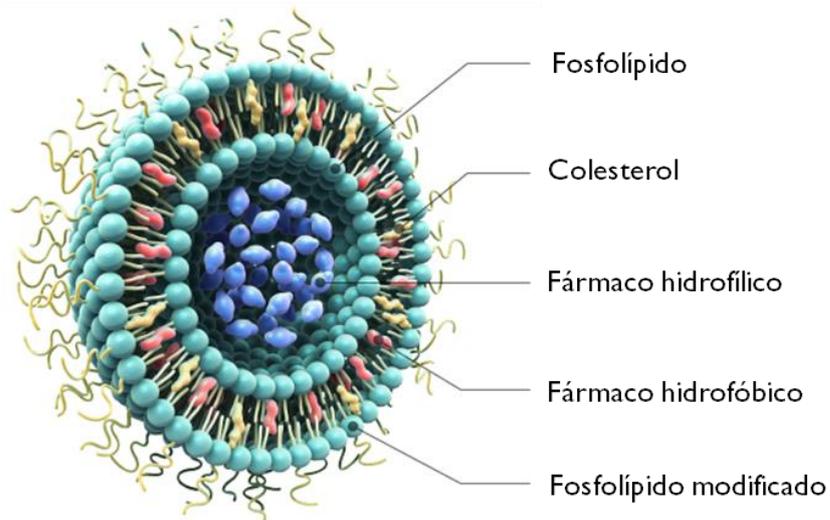
Faço um balanço bastante positivo da minha experiência na Bluepharma. Pude verificar que a empresa assume uma postura proactiva na receção de estagiários, empenhando-se em incluí-los na cultura empresarial e em conferir-lhes responsabilidade. Neste sentido, as minhas expectativas foram superadas, pois senti que tive controlo sobre o meu trabalho e que este foi relevante para o Setor de I&IT. Também fiquei consciente dos desafios que se colocam à indústria farmacêutica no contexto da I&D, como o conhecimento do mercado farmacêutico, que permite a identificação de oportunidades de inovação, e a conformidade aos requisitos regulamentares, tendo em vista a obtenção de medicamentos com qualidade, segurança e eficácia. Creio que a I&D terá um papel cada vez mais relevante na indústria farmacêutica uma vez que, num mercado caracterizado pela competitividade crescente, a inovação será o seu motor de crescimento e um importante fator de distinção face à concorrência.

BIBLIOGRAFIA

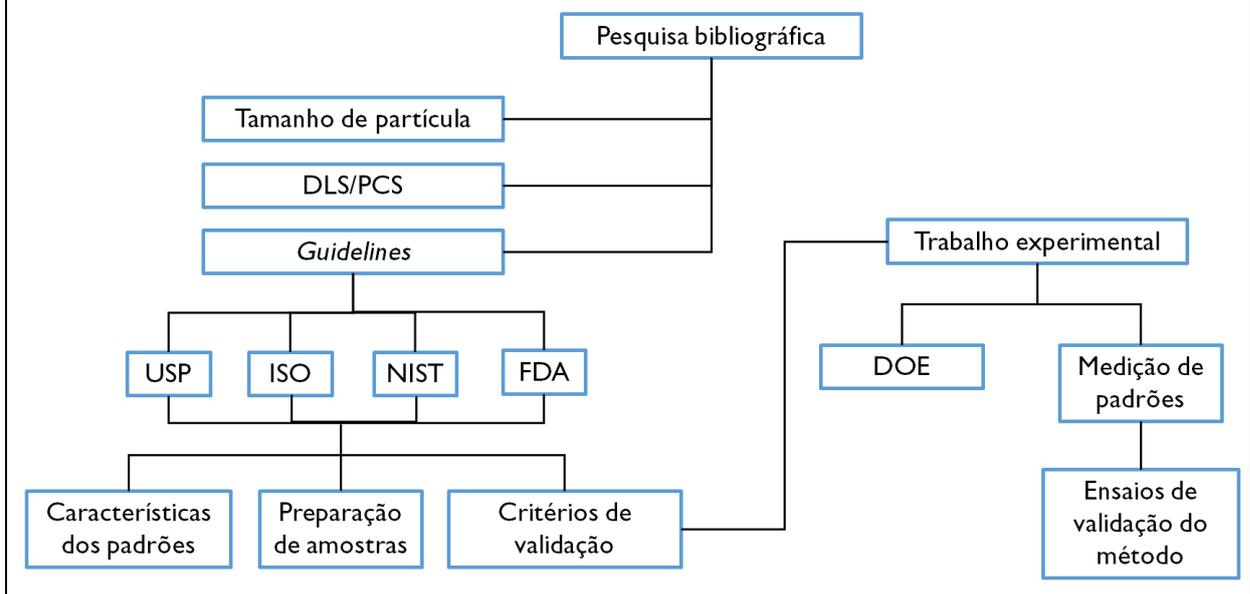
1. BLUEPHARMA – **Quem somos | Bluepharma**. [S.l.]: [s.n.], [s.d.]. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-us.php>
2. BLUEPHARMA – **Missão, Visão e Valores | Bluepharma**. [S.l.]: [s.n.], [s.d.]. [Acedido a 17 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>
3. AKHTAR, N., KHAN, R. A. – **Liposomal systems as viable drug delivery technology for skin cancer sites with an outlook on lipid-based delivery vehicles and diagnostic imaging inputs for skin conditions**. Prog. Lipid Res. 64 (2016) 192-230.
4. PATTNI, B. S., CHUPIN, V. V., TORCHILIN, V. P. – **New Developments in Liposomal Drug Delivery**. Chem. Rev. 115, 19 (2015) 10938-10966.
5. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – **Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation**. [S.l.]: [s.n.], 2018. [Acedido a 16 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm070570.pdf>
6. MADNI, A., SARFRAZ, M., REHMAN, M., AHMAD, M., AKHTAR, N., AHMAD, S., TAHIR, N., IJAZ, S., AL-KASSAS, R., LÖBENBERG, R. – **Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications**. J. Pharm. Pharm. Sci. 17, 3 (2014) 401-426.
7. EASTMAN, S.; REDELMEIER, T. – **A Short Course on the Chemistry Manufacturing and Control of Liposome-based Pharmaceutical Products**. In: TORCHILIN V. Handbook of Nanobiomedical Research: Fundamentals, Applications and Recent Developments. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2014. ISBN: 978-981-4520-66-9, volume 4, p. 145-173.
8. HUPFELD, S., HOLSÆTER, A. M., SKAR, M., FRANTZEN, C. B., BRANDL, M. – **Liposome Size Analysis by Dynamic/Static Light Scattering upon Size Exclusion-/Field Flow-Fractionation**. J. Nanosci. Nanotechnol. 6, 9 (2006) 3025-3031.
9. TSCHARNUTER, W. – **Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing**. In: MEYERS, R. A. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2006. ISBN: 9780470027318, p. 5469-5485.
10. SAS INSTITUTE INC. – **Design of Experiments | JMP**. [S.l.]: [s.n.], [s.d.]. [Acedido a 16 de agosto de 2018]. Disponível na Internet: https://www.jmp.com/en_us/applications/design-of-experiments.html
11. PRECISION NANOSYSTEMS – **Liposomes**. [S.l.]: [s.n.], 2018. [Acedido a 23 de maio de 2018]. Disponível na Internet: <https://www.precisionnanosystems.com/areas-of-interest/formulations/liposomes>

ANEXOS

Anexo 1: Representação esquemática da estrutura básica de um lipossoma. Adaptado de Precision NanoSystems.¹¹



Anexo 2: Resumo esquemático do trabalho realizado no estágio, elaborado no âmbito da exposição oral interna.



Anexo 3: Tabela-resumo da análise SWOT relativa ao estágio em Indústria Farmacêutica.

	Aspetos positivos	Aspetos negativos
Fatores intrínsecos ao estágio	<p><u>PONTOS FORTES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Acolhimento e integração na empresa • Condições de trabalho • Reuniões periódicas • Capacidade de pesquisa e espírito crítico • Apresentação do trabalho desenvolvido • Relevância do trabalho desenvolvido • Domínio da língua inglesa • Evolução do desempenho 	<p><u>PONTOS FRACOS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Falta de conhecimentos específicos • Assimilação de regras estritas no trabalho laboratorial • Registo de fontes de informação • Capacidade de síntese de informação
Fatores exteriores ao desempenho	<p><u>OPORTUNIDADES</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Seleção dos estagiários por entrevista • Contacto com a indústria farmacêutica • Ferramentas e competências de trabalho em investigação • Acompanhamento do trabalho laboratorial 	<p><u>AMEAÇAS</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Escassez de <i>guidelines</i> sobre formulações lipossomais • Implicações da duração do estágio