



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Gustavo de Melo Trovão

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alcalóides Pirrolizidínicos: Toxicidade e Risco de Exposição”, referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, da Dra. Elisabete Alves e do Professor Doutor Carlos Freire Cavaleiro, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Gustavo de Melo Trovão

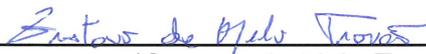
Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alcalóides Pirrolizidínicos: Toxicidade e Risco de Exposição” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Elisabete Alves e do Professor Doutor Carlos Freire Cavaleiro, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020

Eu, Gustavo de Melo Trovão, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009009265, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alcalóides Pirrolizidínicos: Toxicidade e Risco de Exposição” 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 deste Relatório de Estágio, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 17 de Julho de 2020



(Gustavo de Melo Trovão)

ÍNDICE

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas e Siglas.....	7
Introdução.....	8
Análise SWOT	
Pontos Fortes.....	9
Pontos Fracos.....	14
Oportunidades.....	17
Ameaças.....	20
Conclusão	25
Lista de Referências	27

PARTE II – Alcalóides Pirrolizidínicos: Toxicidade e Risco de Exposição

Abreviaturas e Siglas.....	29
Resumo	30
Abstract	31
Introdução.....	33
Alcalóides e Alcalóides Pirrolizidínicos.....	35
Química dos Alcalóides Pirrolizidínicos.....	35
Estrutura e Biossíntese.....	35
Ocorrência Natural	37
Metabolismo, Mecanismo Geral de Toxicidade e Relação Estrutura/Actividade	39
Vias de Destoxificação.....	40
Vias de Bioactivação.....	42
Caracterização da Toxicidade e suas Manifestações	45
Genotoxicidade.....	46
Mutagenicidade.....	47
Teratogenicidade e Fetotoxicidade	49
Carcinogenicidade	52
Hepatotoxicidade	53
Outros Tipos de Toxicidade.....	60
Avaliação do Risco	63
Vias de Exposição	64
Vias Directas	64
Vias Indirectas	68

Estimativas e Determinações Quantitativas	72
Em Humanos	72
Em Estudos Experimentais Animais	73
Determinações Regulamentares de Avaliação Toxicológica.....	76
Conclusão	79
Anexo.....	83
Apêndice.....	89
Lista de Referências	93

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Abreviaturas e Siglas

- MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
- MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica
- PNV – Plano Nacional de Vacinação
- RAM – Reacção Adversa Medicamentosa
- RME – Receita Médica Electrónica
- SNS – Sistema Nacional de Saúde
- SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*
- USF – Unidade de Saúde Familiar

Introdução

O presente relatório tem como objetivo o desenvolvimento de uma reflexão global sobre o estágio curricular efetuado na área de farmácia comunitária, no âmbito da unidade curricular homónima do 5º ano do curso de MICE (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas). O relatório será apresentado sob a forma de uma Análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) em que serão abordados e discutidos os Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças relativamente à experiência do estágio e a considerações sobre a sua envolvimento, características e condicionantes, naturalmente contextualizando-o sob o epíteto da profissão farmacêutica no geral e da prática de farmácia comunitária, em particular. O período de estágio compreendeu os meses decorrentes desde meados de Janeiro a finais de Maio de 2015 e o mesmo foi cumprido na Farmácia Alves, em Coimbra, sob direcção técnica da Dr.^a Elisabete Alves.

Análise SWOT

Pontos Fortes:

- A Farmácia Alves localiza-se em Coimbra, na zona de Lordemão. Tendo como mais próximas a Farmácia de Celas e a Farmácia São Miguel, apresenta-se como o principal local de prestação de serviços farmacêuticos à população de Lordemão e de localidades vizinhas como a Rocha-Nova ou Mainça. Assim sendo, a caracterização da população-alvo da farmácia é tão abrangente quanto as características demográficas da comunidade e os indivíduos que aí residem ou trabalham e que procuram os serviços oferecidos pela farmácia. Por ser maioritariamente uma zona de habitação, onde existe ainda pequena oferta de serviços públicos ou privados e subsistem algumas actividades rurais, parte significativa das pessoas que se deslocam à farmácia são idosos, crónicos e polimedicados. Devido à proximidade a algumas instituições de ensino, uma camada mais jovem da população procura também os serviços que a farmácia oferece. Grande parte dos seus utentes procura informação e aconselhamento sobre patologias agudas menores, habitualmente de resolução rápida, associados a medicação de controlo dos sintomas, consistindo este grupo em pessoas das mais diversas idades e níveis socioeconómicos. Dada ainda a proximidade a um hospital privado, é também frequente o atendimento de utentes com patologias agudas mais incapacitantes ou a iniciar terapêutica crónica pela primeira vez. Ainda de salientar é a existência de um pequeno grupo de utentes que procura apenas ou essencialmente aconselhamento e produtos de dermocosmética e/ou suplementos alimentares. O estágio permitiu assim o contacto com vários tipos de utentes e situações e, de uma forma geral, foi representativo da necessidade que o farmacêutico tem de se adaptar a todas as realidades que compõem o seu campo de actuação.
- A Farmácia Alves abriu ao público no ano de 2011, tendo o edifício no qual funciona sido completamente projectado e construído com este objectivo. Assim, verifica-se a existência de todos os espaços necessários, bem como a organização dos mesmos de acordo com as funções a desempenhar em cada um. É de salientar, por exemplo, a existência de dois gabinetes de utente, nos quais têm lugar as recolhas de sangue para envio para análise, por parte de um laboratório associado, sessões de massagens

terapêuticas, de podologia, de aconselhamento dermocosmético específico, nutrição ou aconselhamento farmacêutico num ambiente de maior privacidade, sendo também os espaços apropriados para a determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos utentes e para a administração de fármacos injectáveis e vacinas não incluídas no PNV (Plano Nacional de Vacinação).

- A Farmácia Alves assegura a prestação dos seus serviços através de uma equipa jovem e bastante dinâmica, que se desdobra na realização de todas as tarefas necessárias ao essencial e bom funcionamento da farmácia. A composição da equipa prestadora de serviços aos utentes é a seguinte:

- Dr.^a Elisabete Alves – Proprietária e Directora Técnica
- Dr.^a Aurora Gonçalves – Farmacêutica Substituta
- Beatriz Santana – Técnica Superior de Farmácia
- Ricardo Silva – Técnico Auxiliar de Farmácia

Através da actuação destes elementos e dos demais, respeitantes às áreas de gestão, contabilidade e limpezas, pude constatar a importância da cooperação entre todos, tendo como fim último o bem-estar do utente. Este terá sempre de passar por um plano físico, assegurado através da medicação e do uso de dispositivos médicos, mas também por um plano psicológico em que o esclarecimento completo do utente acerca do seu estado de saúde, patologias e medicação possa contribuir para que este se aperceba da importância dos seus actos, mantenha um estado de vigilância constante e, ao mesmo tempo, sinta que pode confiar totalmente na equipa da sua farmácia. Para este ponto, é essencial que os profissionais se mostrem sempre disponíveis e restrinjam ao máximo a formação de juízos de valor acerca dos seus utentes, promovendo sempre a acessibilidade aos seus serviços de saúde. Com este fim, a Farmácia Alves proporciona um serviço diário de entrega ao domicílio, bem como, quando necessário, faz o pedido de receitas médicas para os seus utentes crónicos na USF (Unidade de Saúde Familiar) correspondente, procede ao levantamento e aviamento das mesmas e finaliza com a entrega da medicação na morada do utente. Também, em situações de urgência e dada a proximidade à Plural® - principal fornecedor diário da farmácia –, quando um produto requerido pelo utente não se encontra em *stock*, os colaboradores se oferecem para, eles próprios e no momento, se deslocarem ao armazém,

recolhendo o produto e entregando-o de novo na farmácia ou na morada do utente, de modo a poupar-lhe tempo e preocupações. Outro modo ainda de aproximar os utentes à farmácia e à sua equipa é a facilitação do acesso a serviços co-prestados com outras entidades, como sejam a recolha para análise de amostras biológicas e a promoção de sessões de aconselhamento nutricional para grupos específicos. Através destas acções, pude presenciar, durante o meu estágio, uma crescente geração de confiança por parte dos utentes na equipa da farmácia, observando assim a importância da cooperação e honestidade entre todos e da procura constante do bem-estar do utente como o objetivo de todos os dias, tendo sido imprescindível o leque de recursos humanos com o qual trabalhei durante o estágio.

- De especial consideração é então toda a lista de serviços oferecidos pela Farmácia Alves aos seus utentes. Desde os já referidos serviços de entrega ao domicílio, administração de vacinas e injectáveis e serviços concertados com outras entidades/profissionais até à preparação de manipulados, determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos dos utentes e aconselhamento e indicação farmacêutica de acordo com cada situação; pude constatar durante o meu estágio as mais-valias em que estas acções se traduzem para os utentes e como elas se interligam, proporcionando uma rede de cuidados de saúde que assim procura dar resposta às várias necessidades que a população-alvo da farmácia apresenta. De relevância particular considero ser as preparações de manipulados, hoje em dia muitas vezes já ausentes das farmácias comunitárias, e através das quais pude constatar a importância da formação integral do farmacêutico que, não só deve ser apto à realização das técnicas necessárias à tarefa, promovendo a ligação entre a área laboratorial e a clínica, como também se deve encontrar ciente de todas as disposições legais e boas práticas envolvidas e requeridas pelo processo, pelo qual é responsável.¹ Destaco a preparação de uma solução alcoólica saturada de ácido bórico, que tive oportunidade de realizar sob supervisão da farmacêutica substituta. O caso envolveu uma utente do sexo feminino, com cerca de 30 anos de idade e diagnóstico de otite externa, que se fez acompanhar da correspondente prescrição médica. O procedimento técnico passou por pesar 5 g de ácido bórico e adicioná-los, aos poucos, a 75 mL de álcool a 70% (V/V), com agitação de cerca de 20 segundos após cada adição. De seguida, foi adicionado o álcool até que se perfez o volume pretendido de 100 mL. Após repouso de uma hora, com agitações de 20 segundos a cada 15 minutos, a solução foi filtrada e apropriadamente

acondicionada. Deste modo, foi obtida uma solução saturada, apenas com a apresentação de um ligeiro sedimento. O ácido bórico possui atividade bacteriostática e fungistática e tem indicação coincidente com a patologia apresentada pela utente, bem como com alguns casos de otites médias crónicas e no pós-operatório do ouvido.² A preparação é exclusivamente de uso tópico, sendo a aplicação efectuada no canal auditivo externo, de acordo com as indicações prestadas à utente. Este caso foi extremamente importante, na medida em que se tratou de uma situação demonstrativa da importância da formação multidisciplinar do farmacêutico, no contexto da farmácia comunitária, e porque me permitiu aperceber, uma vez mais, das enormes vantagens para a população que advêm da prestação deste tipo de serviços de saúde.

- Um aspecto importante a salientar é o de ter sido, durante todo o tempo de realização do estágio, o único estagiário presente, o que me proporcionou uma passagem completa e demorada por cada parte integrante do funcionamento de uma farmácia e por cada tipo de serviço prestado, tendo tido oportunidade de contactar e actuar a todos os níveis, bem como de questionar, quando em dúvida, e de compreender a relação entre as várias funções. Assim, foi extremamente importante ter iniciado o meu trabalho no processamento de encomendas e na inventariação de *stock* e sua reorganização, de modo a que me pudesse familiarizar com os produtos e normas regentes da sua circulação, numa primeira fase, para depois poder passar para o contacto directo com os utentes, no atendimento, já mais ciente dos restantes aspectos. Isto permitiu-me um maior conhecimento de causa, melhor transposição dos conhecimentos teóricos para a prática, maior confiança na minha actuação e, por conseguinte, maior credibilidade em mim depositada por parte dos utentes, o que levou a uma melhor comunicação e resolução dos seus problemas de saúde.
- Uma faceta importante do papel do farmacêutico comunitário é a necessidade contínua de estabelecer contactos entre os vários intervenientes do circuito do medicamento e os próprios utentes. A construção de pontes de comunicação entre aqueles que produzem, comercializam, promovem e regulam o medicamento, de um lado, e os utentes e aqueles que acompanham o seu estado de saúde, do outro, é fundamental para que ambos compreendam as particularidades e necessidades de cada um. Assim, no seu dia a dia, o farmacêutico tem frequentemente a necessidade de contactar com

outros farmacêuticos, médicos, enfermeiros e demais profissionais de saúde, mas também com distribuidores e delegados de informação médica e ainda com os utentes, seus familiares e outros prestadores de cuidados. Este foi, portanto, um aspecto muito positivo, que pude experimentar durante o estágio, e que me elucidou acerca da importância da comunicação e de um correcto fluxo de informação para a manutenção e melhoramento do estado de saúde de um utente.

- Do mesmo modo, pude constatar a existência de comunicação e cooperação entre outras farmácias em que, havendo casos de ruptura de *stock* de determinado produto requerido pelo utente, disponibilizavam o mesmo para que este lhe pudesse ser cedido no local que lhe era mais cómodo e onde a sua situação era conhecida e acompanhada. Para além disto, qualquer outra informação pertinente acerca de um produto ou procedimento pode ser trocada, quando necessário, assegurando assim o bem-estar do utente como objectivo último.
- Complementando toda a formação teórica ministrada no MICF e a prática profissional iniciada no estágio, as formações dirigidas aos farmacêuticos e restantes colaboradores da farmácia comunitária são ferramentas essenciais para consolidar certos aspectos e aprofundar alguns temas menos ubíquos na nossa formação de base. De carácter mais científico, de modo a proporcionar bases de entendimento para uma conduta de actuação profissional ou de carácter mais comercial, dando a conhecer produtos e ensinando sobre as situações do seu uso, estas acções de formação promovem a máxima de que nunca se deve verdadeiramente deixar de estudar. Tendo tido oportunidade de participar apenas em duas durante o período de estágio, senti que foram mais valias tremendas para a sensibilização e entendimento dos temas abordados; o que se verifica ainda mais nos casos de produtos dermocosméticos e de uso veterinário, por exemplo. Assim, pude perceber que, para esclarecer o utente, é absolutamente necessário que o profissional de saúde esteja, também ele, esclarecido e elucidado sobre a forma como vai comunicar com o mesmo, consistindo estas formações, na minha opinião, um modo extremamente útil de transformar o conhecimento teórico em conhecimento prático.

- Sendo consequência natural de um estágio em farmácia comunitária, de importância central, embora de observação evidente, destaco o facto de ter tido oportunidade de contactar com todo o tipo de medicamentos, dispositivos médicos e outros instrumentos e equipamentos na esfera de atuação comunitária. Pude, portanto, conhecer e manusear muitos produtos e medicamentos dos quais, até aí, apenas tinha tido informação teórica, bem como ter contacto pela primeira vez com tantos outros que previamente desconhecia. Devido à proximidade da Farmácia Alves a um hospital veterinário e à ainda subsistente actividade rural de alguma da população residente na região, por exemplo, um grupo frequentemente solicitado é o dos produtos de uso veterinário. Embora não negligenciados na sua dimensão académica, estes produtos têm uma expressão reduzida no plano de estudos do MICF, tendo sido um desafio o seu conhecimento e o das situações em que são apropriados. O mesmo se passou com os produtos de dermofarmácia e cosméticos, em que as marcas são muitas, as gamas são extensas e as possibilidades de combinação para cada situação inúmeras. Assim, a frequência deste estágio não somente se me apresentou como um exercício de aplicação dos conhecimentos teóricos como também, e o que é mais importante, me consciencializou da abrangência da actuação do farmacêutico, da necessidade de conhecer e dominar os produtos e conteúdos com que lida diariamente e da responsabilidade que este apresenta perante a sociedade como profissional de saúde. Deste modo, na minha opinião, o mais importante ponto positivo a registar da frequência deste estágio foi, então, a própria experiência em que ele consistiu e o da sua realização, como profissional de saúde, a par com colegas com o mesmo objectivo profissional e em que pude, pela primeira vez, perceber o valor real da formação e confiança que me foram disponibilizadas.

Pontos Fracos:

- O mais evidente ponto fraco a apontar no decurso do estágio foi, naturalmente, a constatação de um desconhecimento de grande parte dos produtos e referências existentes na farmácia, alguns dos quais frequentemente solicitados e cuja familiarização se impunha com urgência. Este tornou-se, pois, um objectivo a curto, médio, mas também a longo prazo, sendo uma competência que nunca está adquirida na totalidade e cuja aquisição é uma responsabilidade contínua de qualquer profissional farmacêutico. Faz então parte da acção do farmacêutico a manipulação e cedência de

informação acerca de todo o tipo de medicação, sujeita ou não a receita médica, produtos de dermofarmácia e cosméticos, produtos à base de plantas medicinais, suplementos alimentares, medicamentos homeopáticos, materiais ortopédicos, de penso e higiene e tantos outros dispositivos médicos. Em acréscimo a esta dificuldade, proveniente do facto do estágio ter sido a minha primeira experiência profissional em ambiente comunitário, verifico ainda o desconhecimento, também ele previsível e pela mesma razão, do nome comercial de muitos produtos; o que, naturalmente, dificulta a comunicação com os utentes e a tradução do conhecimento teórico em prático. A estas exigências junta-se também a de distinguir diferentes indicações para diferentes dosagens ou formas farmacêuticas do mesmo princípio ativo ou ainda a de utilização, numa determinada situação, de um produto ao invés de outro semelhante, cujas características fazem dele uma melhor opção para o caso específico em consideração. Assim, são inúmeros os factores a ter em conta, para além dos nomes dos produtos e sua constituição, todos importantes e cujo conhecimento e manipulação contribuem para o papel que o farmacêutico tem na sociedade e na responsabilidade para com os seus utentes.

- A par com o ponto anterior, houve ainda a necessidade de aprender, interiorizar e mecanizar certos aspectos componentes de mecanismos de actuação interna em farmácia comunitária, e na Farmácia Alves em específico. Estes consistiram em procedimentos dos mais variados tipos, desde a introdução, processamento e gestão de dados no sistema informático *Sifarma2000®*, respeitantes às diversas áreas de funcionamento da farmácia, passando pelos vários registos legais e sua comunicação às entidades de Saúde e das farmácias, mesmo até aos métodos correctos de abordagem dos utentes e de comunicação e resolução dos seus problemas de saúde. Desta forma, como é natural a alguém que previamente desconheça este tipo de actuações, e acrescendo ainda a necessidade de expedição que um serviço de atendimento ao público encerra, todas estas acções se revestiram de particulares cuidados e de especiais dificuldades que, assim, no seu conjunto, se podem apresentar como um ponto menos positivo da realização do estágio.
- Parte integrante e fulcral do trabalho de um profissional de saúde é o contacto e comunicação com os utentes que com este se deparam. Esta comunicação, por ter

muitas vezes como foco assuntos de particular relevância e sensibilidade para os utentes, nem sempre é fácil e deve ser revestida de especiais cuidados, sempre adaptada a cada situação, contexto e pessoas em questão. Independentemente deste tipo de actuação, gera-se, por vezes, alguma desconfiança por parte dos utentes em relação aos profissionais de saúde e à sua conduta, ao nível dos diferentes pontos de acesso ao sistema de saúde. Outras vezes, por razões pessoais, profissionais ou relacionadas com a própria doença, os utentes encontram-se mais desconfortáveis nestas situações, inevitavelmente acabando por condicionar o momento comunicativo e, em última análise, por prejudicar a sua relação com a doença e o processo de tratamento. Por vezes, pude presenciar alguma indisponibilidade dos utentes em prestar ou mesmo em receber informações acerca da terapêutica e/ou da patologia associada, bem como relativas à necessidade de alterar certos comportamentos ou ainda à instrução de alguns procedimentos. Aliado a estas ocorrências ou ainda noutras ocasiões, pude observar também, embora de forma menos frequente, um certo direccionamento de frustrações ou confusões contra os profissionais da farmácia. Estes acontecimentos, ainda que muitas vezes compreensíveis e naturais, dificultam a relação profissional de saúde-utente e, embora de ocorrência diminuta, são indesejáveis; tendo, por isso, aqueles a que assisti e em que tomei parte, consistido num ponto negativo do meu estágio.

- Embora de extensão considerável, o estágio, de cerca de cinco meses de duração, constituiu um tempo ainda insuficiente para experimentar todos os âmbitos que um trabalho de farmácia comunitária pode abarcar. De facto, embora algumas situações sejam muito mais comuns do que outras, devido à prevalência de determinada patologia na população, sazonalidade ou tendências no que diz respeito à literacia em saúde e em cuidados cosméticos, tive sempre a oportunidade de experimentar uma grande variedade de casos distintos ao longo do estágio, havendo, no entanto, certas conjunturas que não ocorreram neste período. Exemplo disso mesmo foi a não ocorrência de notificações de casos de RAMs (Reacções Adversas Medicamentosas). Se bem que observações por parte dos doentes, seus familiares ou dos profissionais de saúde em relação à índole, gravidade ou frequência de determinada reacção adversa verificada e com suspeita de correlação com medicamentos possam não ser notadas e reportadas frequentemente, as farmácias comunitárias são importantes pontos de comunicação e registo destas ocorrências. É também possível citar a não solicitação

de contracepção de emergência ou de produtos de auxílio à cessação tabágica, a título de exemplo. Tendo estas situações consistido em apenas alguns casos que não pude presenciar, por entre tantos outros aos quais se poderia fazer referência, constato que estas ausências, muito embora não se apresentando directamente como algo de negativo que tenha ocorrido durante o estágio, o condicionaram na sua riqueza de experiências e, portanto, interpreto-as como pontos fracos do mesmo.

- Considero ainda importante, a par com a componente pedagógica e profissional que salientei, a referência a circunstâncias pessoais difíceis, ocorridas no período em questão, que naturalmente se reflectiram na minha prestação e terão certamente influenciado a minha actuação em determinados momentos e/ou situações com que me deparei durante o estágio.

Oportunidades:

- Durante a realização do estágio, tive a oportunidade de contactar com profissionais competentes, com formações académicas diversas, desde a equipa da farmácia até aos profissionais com que a mesma colabora (enfermeira, nutricionista, podologista, etc), que sempre souberam aliar o *know-how* técnico com a sensibilidade, empatia e comunicacionalidade requeridas por cada uma das suas funções. É, pois, necessário garantir que assim se continue a passar e que os profissionais farmacêuticos se apresentem no mercado de trabalho cada vez mais bem formados, informados e actualizados nas questões prementes científicas e ainda dotados, o melhor possível, das competências humanas e demais *soft-skills* que se querem inerentes a um profissional de saúde. Assim, a vasta e sólida formação do farmacêutico tem sido e deverá continuar a ser uma mais-valia para a integração e execução das suas funções nas variadas posições ao serviço da sociedade que este pode tomar e com benefícios para a mesma. De forma a consegui-lo, é essencial que se responda à necessidade contínua de formação com constantes e atentas renovações e adaptações curriculares e com a oferta de novos, adequados, co-integrados e úteis processos de aprendizagem e momentos formativos, que efetivamente se vejam transpostos para a prática farmacêutica diária e que propiciem à interligação dos cuidados farmacêuticos com

outros cuidados prestados através dos diferentes canais do SNS (Sistema Nacional de Saúde). De facto, aliada a este necessário e estratégico programa de momentos de formação teórica e prática, a formação base do farmacêutico permite, desde já, alargar a gama de actividades que este exerce, não apenas no âmbito comunitário mas como um profissional de saúde capaz de se movimentar nos vários meios de actuação onde já se estabeleceu; dotado da capacidade de formação de pontes entre várias áreas, desde as mais laboratoriais até às mais clínicas (ambas presentes no exercício da actividade comunitária), entre vários profissionais de saúde e entre as várias fases de acompanhamento profissional, pelas quais certos doentes têm necessariamente de atravessar. Deste modo, o farmacêutico tem a possibilidade de ver a sua experiência e conhecimento traduzidos numa prática mais completa, interligada e integral, em favor de uma sociedade mais rica em literacia científica e no que à sua própria saúde diz respeito. Para isto, é essencial que sejam criados novos serviços farmacêuticos, mais centrados no doente e de acordo com as suas necessidades específicas. É necessário que se ganhem novas responsabilidades perante os doentes/utentes e que assim se possam estabelecer maiores níveis de confiança entre eles e o farmacêutico, mudando o paradigma e afirmando-se este como um profissional de saúde, e não apenas como o profissional do medicamento. Iniciativas como a criação de acções de formação para doentes portadores de doenças crónicas e multifactoriais; sobre saúde familiar e comunitária; higiene geral e local e conceitos epidemiológicos; genética e idiossincrasias medicamentosas; cuidados físicos e ortopédicos; de nutrição; sobre o uso integrado de práticas medicinais tradicionais e medicina e farmácia ocidentais; produtos vegetais e incorporação dos seus extractos nas formulações farmacêuticas; bem como algumas noções básicas de reconhecimento clínico; perigos da automedicação; e alguns conceitos farmacológicos são algumas actividades ainda pouco ou nada exploradas, sob a perspectiva da transmissão de conhecimento aos cidadãos, que poderão ser fundamentais para a instrução de uma sociedade que se quer mais informada e consciente; sendo certamente valiosas oportunidades para o farmacêutico se afirmar e desempenhar um papel mais preponderante e interventivo na sua comunidade. De importância vital e ainda com extensão pouco expressiva é a implementação de programas de acompanhamento farmacoterapêutico activo nas farmácias comunitárias. Se é certo que o acompanhamento da terapia do doente é parte integrante do acto farmacêutico e do dia-a-dia de um profissional comunitário, praticamente em cada atendimento, existe um grande potencial de aproveitamento dos conhecimentos e capacidades do mesmo para a aplicação sistemática de trabalhos de revisão da

terapêutica a grupos fixos de doentes que, por vários critérios, tenham necessidade ou vantagem evidente em beneficiar deste serviço, que se compreende no que de mais nuclear tem a formação académica do farmacêutico; não obstante a crucial, necessária e desejada intercomunicação contínua que sempre se tem de dar entre o mesmo e os restantes profissionais de saúde. Este serviço, em larga escala e num modelo que envolva o acesso fácil a todo o historial clínico do doente e a todos os profissionais de saúde envolvidos, poderá então ser uma peça elementar e extremamente importante na integração das várias áreas de actuação farmacêutica, desde as laboratoriais às clínicas, a partir de um ponto de acesso directo, simples e cómodo para o doente, como é a farmácia comunitária.

- No actual paradigma da medicina contemporânea, a polifarmácia é uma realidade comum e ubíqua e as alternativas que se apresentam são diversas na sua origem e natureza, cada vez mais acessíveis e em maior número. Com o aumento da consciencialização para a saúde e a decorrente procura crescente de bem-estar por parte dos cidadãos (desde logo cada vez mais jovens), a oferta de novos e/ou melhorados serviços e a familiarização do farmacêutico com diferentes tipos de produtos e referências são também cada vez mais prementes; seja para um bom trabalho de acompanhamento farmacoterapêutico ou apenas para o melhor e mais adequado aconselhamento a cada situação. Este representa, em cada vez maior grau, a entidade na qual os doentes confiam, quando confrontados com situações potencialmente resolvíveis através da prática de automedicação, prevista através do uso de MNSRM (Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica) e em certas situações legalmente enquadradas.³ Por conseguinte, mais do que em qualquer momento anterior, é no farmacêutico que se encontra a autoridade para desmistificar, informar, ensinar e manter, na melhor medida possível, o uso responsável e eficaz de substâncias de carácter medicamentoso ou semelhante, de entre as tantas categorizadas como não sujeitas a receita médica, dermocosméticas e suplementos alimentares, aos quais se juntam os, cada vez mais procurados, medicamentos homeopáticos e fitoterápicos. Assim, o farmacêutico tem nestes produtos, não só uma acrescentada responsabilidade, como também uma oportunidade para se afirmar como um importante elo da corrente pelo zelo da saúde na comunidade. Para que estes objectivos sejam concretizados é, em última análise, necessária e urgente uma especialização aprofundada e mais completa nos assuntos que concernam

determinadas situações clínicas, produtos ou actuações no âmbito da actividade farmacêutica. É, pois, a juntar aos já referidos momentos de formação, de inegáveis consequências benéficas considerar uma especialização na área de actuação seleccionada. A este respeito, é importante verificar que a área da farmácia comunitária é, ela própria, já contemplada com uma formação de especialização de longo prazo, confirmando-se aquela como uma vertente bastante rica da prática farmacêutica e esta como uma importante oportunidade de aprofundamento, tão necessária nos dias de hoje para a massa profissional que desempenha as tarefas que estas englobam.

Ameaças:

- Certas conjunturas existem no meio farmacêutico, da farmácia comunitária em particular, e da condição de estagiário em específico, passíveis de serem encaradas, de uma forma ou de outra, como limitadoras ao exercício ideal da profissão e àquilo que é a sensação de missão que o farmacêutico, como profissional de saúde, possui. A que mais se destacou durante a realização do estágio foi, naturalmente, a demonstração por parte de alguns utentes, embora não de forma amígdica, de uma sensação de certo distanciamento, frieza e/ou desconfiança pela figura do estagiário. A natural falta de experiência na área, juntamente com uma cara nova no atendimento aos utentes regulares e a identificação de estagiário terão provocado em alguns, como é compreensível, uma sensação de receio acerca das informações e aconselhamentos que por mim lhes eram transmitidos. Desta forma, embora não o manifestassem abertamente, procuravam confirmação nos restantes elementos da equipa da farmácia, ao que lhes era reforçada a linha de actuação indicada, salvaguardadas novas informações ou passavam a ser alvo de uma diferente estratégia de comunicação, assegurando sempre que os mesmos saíam totalmente confiantes e esclarecidos acerca da sua terapêutica ou de qualquer outra consideração necessária. Adicionalmente a esta circunstância, a condição de um utente cada vez mais informado tem também de ser considerada. Numa era tão profusamente tecnológica e de tendência informativa como aquela em que vivemos, o utente apresenta-se como alguém mais interessado na sua saúde, mais informado e alguém cujo entendimento da sua situação clínica vem antes da possibilidade de a melhorar, como aliás é desejável, de forma a que a terapêutica seja instituída da melhor forma e com o máximo possível de adesão. No

entanto, a informação prévia a que o utente tem acesso pode não ser a melhor e não é, com certeza, integrada com as restantes condições clínicas e farmacoterapêuticas, diferentemente do modo que um profissional de saúde tem capacidade para fazer. Para além disso, o utente pode vir muitas vezes com ideias enviesadas, pré-concebidas, a partir de algo que leu, de publicidade ou de alguém próximo que o aconselhou e assim dificultar uma avaliação mais correcta da sua situação ou a cedência daquilo que seria a terapêutica mais apropriada. Faz, portanto, parte da actuação do farmacêutico que as ideias erradas sejam desconstruídas e que toda a informação necessária acerca da sua terapêutica e situação clínica seja prestada, assegurando-se que o utente entende o seu papel na gestão da própria saúde e estabelecendo um maior plano de entendimento, conducente a uma mais estável relação de confiança com todos os elementos da equipa da farmácia. Desta forma, do que seriam potenciais ameaças ao pleno desempenho do profissional farmacêutico e à consecução dos objectivos pretendidos, é possível uma conversão em ganhos para a saúde da comunidade e uma relação mais próxima e honesta dos utentes com os profissionais da farmácia.

- Uma outra ocorrência capaz de deteriorar a relação entre doente e farmacêutico é a falta de compreensão daquele para a impossibilidade de cedência de MSRM (Medicamentos Sujeitos a Receita Médica), quando não acompanhado da correspondente receita. Frequentemente, utentes pela primeira vez na farmácia requerem o que dizem ser a sua terapêutica hipnótica ou antidepressiva habitual ou outro tipo de medicação altamente específica num contexto comunitário, sem que com isso apresentem a necessária prescrição médica e sem que entendam que tal cedência não é possível. Mais comum ainda é o caso dos pedidos de antibióticos. Este tipo de atitude por parte dos utentes lança, desde logo, as bases para uma comunicação difícil e tensa, prejudicial àquela que é desejável e essencial para uma boa actuação em saúde; devendo, portanto, a mesma ser desencorajada e o utente esclarecido quanto às razões que levam a que isto aconteça. No caso de um pedido de cedência de antibiótico, é também de extrema importância que durante o atendimento seja auferida a razão pelo qual o utente pensa necessitar do mesmo, dado que, muitas vezes, o problema de saúde em causa é ligeiro, autolimitado e não é aplicável sequer o uso de antibiótico, podendo os sintomas serem controlados com recurso a MNSRM. Em caso contrário, deve ser dada indicação ao doente da necessidade de recorrer a uma consulta médica,

dando assim continuidade à incursão do mesmo no SNS, a qual se iniciou na farmácia comunitária.

- Noutro plano, mas com semelhante potencial para prejudicar aquilo que é a interacção do utente com a equipa da farmácia, estão possíveis ocorrências que, não sendo habituais, podem causar desconforto ou desconfiança dos utentes na actuação farmacêutica e naquilo que é a gestão de um estabelecimento de saúde, directamente se refletindo na disponibilidade e honestidade com que o utente ali se dirige. Alterações de métodos e procedimentos, voluntária ou involuntariamente, muitas vezes dependentes de circunstâncias e condicionantes externas, são acções passíveis de gerar confusão e desconforto, nomeadamente nos utentes mais idosos, que se veem expostos a situações para as quais não se encontram preparados e que, assim, manifestam a sua incompreensão; a qual, por vezes, se pode traduzir em alguma animosidade contra a equipa da farmácia. A crescente informatização, por exemplo, de todos os processos inerentes a um atendimento, se bem que facilitadores a médio e longo prazo, provocam, de um dia para o outro, mudanças relativamente às quais tanto os elementos da farmácia como os utentes têm de aprender a se adaptar. A introdução em vigor da RME (Receita Médica Electrónica), sensivelmente a meio do meu período de estágio, foi uma dessas alterações, a que a maioria dos utentes correspondeu de forma positiva mas que originou em alguns uma necessidade maior de explicação e uma atenção especial nos momentos da dispensa, assegurando-nos sempre de que o utente entendeu todos os processos envolvidos, de forma a que possa fazer uma melhor gestão da sua terapêutica sem que nada do que necessita lhe falte. Outro exemplo claro de ocorrências com potencial disruptivo para o entendimento do doente da sua terapêutica é a própria alteração à mesma, nomeadamente quando sugerida ou indicada por outros profissionais de saúde e que lhe podem provocar confusão durante a dispensa na farmácia, particularmente no momento da cedência das respectivas informações. Doentes idosos, polimedicados, não entendem, por vezes, as razões das mudanças na terapêutica e tendem a confundir as novas estratégias posológicas. Quando esses doentes direccionam a sua confusão e frustração contra a equipa da farmácia pode tornar-se ainda mais difícil a comunicação, sendo que apelar à calma e fazer uso de uma comunicação mais adaptada à pessoa em causa pode ser a chave para a resolução do problema. Neste contexto, é também de considerar a elaboração de um plano terapêutico diário ou semanal, com indicação dos

nomes dos medicamentos (a associação dos mesmos com as cores que as fórmulas farmacêuticas sólidas apresentam é também uma possibilidade), a posologia e as suas indicações terapêuticas. Poderá também ser organizada na farmácia a individualização da terapêutica semanal em recipientes próprios para o efeito, que posteriormente serão entregues ao doente ou cuidador para que assim lhes seja facilitada a toma dos mesmos. Uma outra alteração à qual os utentes tendencialmente não reagem de forma favorável, totalmente externa à gestão da farmácia, é, compreensivelmente, a subida do preço de certos medicamentos. Tendo em consideração a desfavorável situação económica global e, em especial, as dificuldades financeiras evidentes nas camadas mais idosas, criticamente dependentes da acção farmacológica para a manutenção do seu estado de saúde, este factor ganha ainda mais relevo na decisão de aquisição ou não da terapêutica, sendo uma situação desestabilizante e, porventura, fracturante quando o utente não compreende as razões que lhe dão origem ou pensa que a decisão provém de uma ação de gestão interna da farmácia. Em agravante, dá-se por vezes o facto de os valores patentes nas Guias de Tratamento, anexas às receitas, não coincidirem, por diversas razões, com os preços que os produtos apresentam, por lei, no momento da dispensa, mesmo face à escolha do utente pela opção mais barata, a qual a farmácia é obrigada a possuir. Esta situação, muitas vezes decorrente de falta de actualização informática ou apenas de erros ocasionais, promovem também o surgimento de uma sensação de desconfiança e até de revolta do utente para com a equipa da farmácia. A isto se juntam as ocorrências, infelizmente cada vez mais comuns, de ruptura de *stock* e de descontinuação de certos produtos. A estas conjunturas alguns utentes reagem com um sentimento de quebra de confiança para com aquele estabelecimento de saúde, na sua responsabilidade de os servir, levando a que a disponibilidade do mesmo para escutar, perguntar e cumprir a terapêutica possa, em certos casos menos comuns, ficar diminuída. Da mesma forma sucedem também alguns episódios nos quais a cedência de medicação não pode ser efetuada devido a impedimentos técnicos, como uma receita médica incompleta, mal preenchida ou já fora do prazo de validade, sendo estas, muitas vezes, razões que o utente não entende como sendo bloqueadoras do processo de dispensa da terapêutica, frequentemente já habitual para o mesmo. Todas estas circunstâncias fazem parte do dia-a-dia de um profissional de farmácia comunitária e constituem obstáculos que o farmacêutico deve ser capaz de diminuir, resolver e/ou ultrapassar em favor da melhor relação possível com os seus utentes/doentes, tendo sempre em vista, em última análise, a manutenção do melhor

estado de saúde possível da sociedade e, em especial, da comunidade que este serve e onde se insere.

- Reflectindo a tendência moderna de inúmeras áreas do saber e da transferência de bens em se diversificarem no seu aspecto e abordagens e se renovarem na apresentação dos seus conteúdos; sob a implementação de conceitos e visões próprias, o sector da saúde e do medicamento tem vindo a tornar-se cada vez mais ubíquo. A farmácia não mais detém a exclusividade do estatuto de ponto de cedência de produtos com acção farmacológica e dispositivos médicos auxiliares, nem já sequer é o único ponto de fornecimento de inúmeros serviços de saúde. Cabe aos profissionais de saúde, e em especial ao farmacêutico, a responsabilidade e necessidade de informar a sociedade, de desmistificar certas ideias pré-concebidas, desconstruir novas tendências naquilo que realmente são, explicar a sua origem e a sua essência e inculcar na comunidade uma noção verdadeira do que é uma visão integrada da farmácia e da medicina nos dias de hoje e da responsabilidade de cada um na sua própria saúde.

Conclusão

Em suma, a realização deste estágio permitiu-me um primeiro contacto com o mercado de trabalho e com a realidade do mundo farmacêutico, enriquecido por todas as qualidades e desafios inerentes à prática do exercício de farmácia comunitária. Foram encontrados obstáculos e dificuldades, próprios de quem tem pela primeira vez uma experiência profissional, e outros que constituem parte da profissão, com os quais de forma amiúde nos deparamos. Os mesmos foram sendo ultrapassados através do recurso a estratégias de comunicação, para com os utentes e os elementos da equipa da farmácia e entidades externas das quais o seu funcionamento depende; sempre mantendo a calma, o bom senso e fazendo uso de toda a formação ministrada ao longo do percurso do MICF. A localização da farmácia permitiu um maior contacto com muitos utentes que ali se deslocam frequentemente, oferecendo uma visão mais integral daquilo que são os problemas de saúde e as preocupações de uma comunidade constituída, maioritariamente, por doentes de uma idade mais avançada, crónicos e polimedicados, mas também de uma porção da mesma mais jovem, que mais facilmente procura soluções de bem-estar e a resolução de problemas mais pontuais. A monitorização e acompanhamento de parâmetros fisiológicos e bioquímicos de alguns utentes foi também uma experiência importante, na medida em que esta se revela essencial para uma quantificação da eficiência da terapêutica, para o reconhecimento de uma resposta atípica, aliado aos relatos dos doentes, e até como um mecanismo capaz de promover a adesão à terapêutica. Foi também importante e estimulante o facto de me ver rodeado por outros profissionais de saúde, com os quais a Farmácia Alves colabora, o que reforçou ainda mais a noção de que o farmacêutico, como qualquer outro profissional de saúde, não deve cingir-se à sua bolha de actuação e deve procurar o contacto contínuo com outros profissionais, com ou sem ligação aos utentes que a ele se dirigem. Esta circunstância fez-me desejar que, no futuro, possa existir uma colaboração ainda mais estreita com todos os profissionais envolvidos directa ou indirectamente na saúde da população, a qual muito depende também do esforço e da disponibilidade do farmacêutico que, na farmácia comunitária, muitas vezes é o primeiro a receber um doente que poderá ter de vir a seguir por outras vias do SNS. Por fim, a realização deste estágio veio, uma vez mais, confirmar a necessidade contínua que o farmacêutico tem de alargar o seus conhecimentos e competências, para além daquilo que desenvolveu durante o MICF, assim como reforçou a ideia de que é essencial a prossecução de um período de especialização, seja qual for a sua área de actuação, com vista a melhor poder responder aos desafios crescentes que se lhe impõem e a poder aceitar novas e cruciais

responsabilidades de uma forma mais segura e completa. O estágio curricular em farmácia comunitária é, pois, não só um espaço de aplicação dos conhecimentos apreendidos durante o curso, mas principalmente um ponto culminante do mesmo que encerra em si tanto ou mais conteúdo que aquele previamente adquirido; tornando-se assim num processo crucial e indispensável para a finalização da formação em Ciências Farmacêuticas e para a preparação daquilo que será o futuro profissional de cada um.

Lista de Referências

1. – SAÚDE, Ministério da – Portaria nº 594/2004, de 2 de Junho – Aprova as Boas Práticas a Observar na Preparação de Medicamentos Manipulados em Farmácia de Oficina e Hospitalar. Diário da República, Série I-B.
2. – PORTUGUÊS, Formulário Galénico – A. II. I - Solução Alcoólica de Ácido Bórico à Saturação. 2001.
3. – SAÚDE, Ministério da – Despacho nº 17690/2007, de 23 de Julho – Lista das Situações de Automedicação. Diário da República, Série II, nº 154.

PARTE I=

**ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS:
TOXICIDADE E RISCO DE EXPOSIÇÃO**

Abreviaturas e Siglas

- ANZFA – *Australia New Zealand Food Authority*
- BfR – *Bundesinstitut für Risikobewertung*
- COT – *Committee on Toxicity*
- CYP – *Cytochrome P450* – Citocromo P450
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid* – Ácido Desoxirribonucleico
- EFSA – *European Food Safety Authority*
- EMA – *European Medicines Agency*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- GST – *Glutathione-S-Transferase*
- HSOS – *Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome* – Síndrome Hepática de Obstrução Sinusoidal
- IL – *Interleucina*
- IARC – *International Agency for Research on Cancer*
- i.p. – *Via Intraperitoneal*
- LD₅₀ – *Lethal Dose for 50%* – Dose Letal a 50%
- MOE – *Margin of Exposure* – Margem de Exposição
- OMS – *Organização Mundial de Saúde*
- PA – *Pyrrolizidine Alkaloid* – Alcalóide Pirrolizidínico
- RNA – *Ribonucleic Acid* – Ácido Ribonucleico
- SCE – *Sister Chromatid Exchange*
- SLRL – *Sex-Linked Recessive Lethal Assay*
- SMART – *Somatic Mutation and Recombination Test*
- SNC – *Sistema Nervoso Central*
- TDI – *Tolerable Daily Intake* – Dose Diária Tolerável
- TNF- α – *Tumor Necrosis Factor Alfa* – Factor de Necrose Tumoral Alfa
- UDS – *Unscheduled DNA Synthesis*
- VEGF – *Vascular Endothelial Growth Factor* – Factor de Crescimento Endotelial Vascular
- VOD – *Veno-Occlusive Disease* – Doença Venó-Oclusiva

Resumo

Os alcalóides pirrolizidínicos (PAs) são uma classe de compostos de origem natural com ampla distribuição geográfica, sendo frequentemente encontrados em diversas famílias e géneros vegetais. Estima-se que o número de PA conhecidos se situe entre 400 e 650, tendo já sido encontrados em, pelo menos, 15 famílias de plantas, das quais 13 são de angiospérmicas, e em mais de 350 espécies. São considerados as toxinas de origem vegetal responsáveis pelo maior número de episódios de intoxicações acidentais em humanos e animais e admite-se que muitos outros casos não cheguem a ser registados. No entanto, a detecção e quantificação dos PAs nas diversas espécies em que estes se encontram, assim como a sua ocorrência em produtos potencialmente contaminados, nunca foram alvo de uma abordagem de estudo sistemática e extensiva. A toxicidade destas substâncias tem vindo a ser estudada em diversas vertentes, particularmente no que diz respeito ao seu mecanismo de acção e às suas interacções a nível celular e molecular e respectivas consequências fisiopatológicas. Assim, combinando os resultados disponíveis das análises aos casos de toxicidade em humanos e as observações e quantificações resultantes de estudos experimentais em animais, verifica-se que os PAs estão associados a genotoxicidade e mutagénese, teratogénese e fetotoxicidade, carcinogénese, hepatotoxicidade, pneumotoxicidade e cardiotoxicidade, entre outros tipos de acções e manifestações. A manifestação patológica mais característica da intoxicação por PAs é o desenvolvimento da Síndrome Hepática de Obstrução Sinusoidal. As vias mais comuns de exposição aos PAs são a utilização de preparações de medicina tradicional e de produtos medicinais à base de plantas, de suplementos alimentares, assim como o consumo de certos alimentos. A utilização destes produtos vegetais tem-se vindo a generalizar, sem que, no entanto, o controlo da sua qualidade tenha acompanhado este facto. Um dos aspectos mais importantes a considerar é a utilização de infusões preparadas com plantas produtoras de PAs. Quanto à exposição por via alimentar, só excepcionalmente se registaram casos de contaminação aguda e/ou em grande escala. É, contudo, importante considerar a potencial ocorrência destes compostos, em pequenas quantidades, em alimentos habitualmente consumidos de forma diária, pois é a exposição crónica que está associada aos fenómenos de toxicidade mais preocupantes. Tendo em conta o seu enquadramento teórico e a realidade da sua ocorrência quotidiana, é então de extrema importância a consideração da avaliação do risco dos PAs e do seu potencial de exposição para os humanos. Este trabalho propõe-se a fazer uma revisão da evidência científica disponível para a caracterização da toxicidade dos

PAs e fazer um ponto da situação relativo à avaliação do risco que estes efectivamente apresentam para a saúde humana.

Palavras-Chave:

Alcalóides Pirrolizidínicos, Metabolização, Bioactivação, Toxicidade, Genotoxicidade, Hepatotxicidade, VOD, HSOS, Avaliação do Risco, Segurança, Preparações Terapêuticas à Base de Plantas, Alimentos, Doses, Regulamentação

Abstract

Pyrrrolizidine alkaloids (PAs) are a class of compounds of natural origin with a wide geographical distribution, often found in several families and plant genera. The number of known PAs is currently estimated to be between 400 and 650, having already been found in, at least, 15 plant families, of which 13 are angiosperms, and in more than 350 species. They are generally considered to be the plant toxins responsible for the largest number of known episodes of accidental poisoning in humans and animals, while it is estimated that many cases may have not even been reported. However, the detection and quantification of PAs in the various species where they are found, as well as their occurrence in potentially contaminated products, have never been the subject of a systematic and extensive study approach. The toxicity of these substances has been studied in several domains, particularly with regard to their mechanism of action, interactions at cellular and molecular levels and their pathophysiological consequences. Thus, combining the available results of analyses of human toxicity cases and the observations and quantifications resulting from experimental studies in animals, it becomes apparent that PAs are associated with genotoxicity and mutagenesis, teratogenesis and fetotoxicity, carcinogenesis, hepatotoxicity, pneumotoxicity and cardiotoxicity, among other actions and outcomes. The most characteristic pathological manifestation of PA intoxication is the development of Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome. The most common routes of exposure to PAs are the use of traditional medicine preparations and herbal medicinal products, food supplements, as well as the consumption of certain foods. The use of these plant products has become widespread, although without their quality control having followed this fact. One of the most important factors to consider is the use of infusions prepared with

PA-producing plants. With regard to dietary exposure, there only have been exceptional cases of acute and/or large-scale contamination. However, it is important to consider the potential occurrence of these compounds, in small amounts, in foods usually consumed daily, as it is the chronic exposure that is associated with the most worrying phenomena of toxicity. Taking into account their theoretical framework and the reality of their daily occurrence, it is therefore of utmost importance to consider the risk assessment for the PAs and their potential exposure to humans. This work aims to review the scientific evidence available for the characterization of the toxicity of PAs and to take stock of the assessment of the risk they effectively pose to human health.

Key-Words:

Pyrrolizidine Alkaloids, Metabolization, Bioactivation, Toxicity, Genotoxicity, Hepatotoxicity, VOD, HSOS, Risk Assessment, Safety, Herbal Medicinal Products, Food, Doses, Regulatory Affairs

Introdução

Os PAs (*Pyrrolizidine Alkaloids* – Alcalóides Pirrolizidínicos) são uma classe de compostos de origem natural, predominantemente vegetal, que podem ser encontrados em plantas distribuídas um pouco por todo o globo. São considerados os compostos de origem vegetal responsáveis pelo maior número de casos conhecidos de intoxicações acidentais em humanos e animais e calcula-se que muitos outros não cheguem a ser registados como tal.

Apesar dos PAs serem objecto de estudo, desde há já algumas décadas, e da sua toxicidade ter vindo a ser alvo de abordagens e perspectivas multidisciplinares (desde a química, bioquímica, biologia celular e molecular, genética, farmacognosia, toxicologia analítica e outras, até às áreas clínicas), nem sempre a conciliação destas visões parciais é concebida de forma a fornecer um retrato geral dos PAs como agentes de toxicidade – de acordo com o conhecimento disponível até à data – e ainda menos de forma a proporcionar uma base sólida de evidência científica a ser usada para a construção e justificação de uma avaliação geral do risco que os mesmos apresentam para a saúde humana. A urgência desta necessidade é ainda mais notória devido à conjuntura moderna de uma utilização crescente de preparações vegetais das medicinas tradicionais e de produtos medicinais à base de plantas, muitas vezes sem qualquer tipo de controlo da qualidade, conhecimento clínico ou supervisão da terapêutica. Desta forma, longe de constituir um documento de extensão completa a todos os elementos relacionados com o tema, o que não seria possível devido à sua brevidade, a presente monografia propõe-se como um trabalho de revisão, sintético e condensado, da literatura científica relacionada com o estudo da toxicidade dos PAs e com a avaliação do seu risco, de amplitude geral mas abordagem rigorosa. É, pois, objectivo deste trabalho o fornecimento de um quadro de informação científica e técnica que permita a manipulação racional dos conceitos relacionados com os PAs; e a introdução ao contexto e desenvolvimento que se tem verificado no processo de realização de uma avaliação toxicológica do risco destes compostos para a saúde humana.

Para este propósito, a monografia inicia-se por uma introdução ao tema dos alcalóides e dos alcalóides pirrolizidínicos em particular, tanto na sua natureza de metabolitos vegetais e sua ocorrência natural, como na utilização terapêutica que tem sido feita de algumas plantas que os contêm. De seguida é tratada a química dos PAs, desde a sua estrutura e biossíntese ao seu metabolismo e mecanismo geral de toxicidade, atentando na influência que as diferenças estruturais destas substâncias nela têm. Posteriormente, é feita uma caracterização geral dos tipos e manifestações de toxicidade mais frequentes dos PAs nos humanos e animais.

Finalmente, é explorado um conjunto de considerações a ter para a realização de uma avaliação do risco para os PAs – tendo em conta o que foi dito anteriormente –, onde são compilados os valores de estimativas e determinações quantitativas de casos e estudos mais significativos para o estabelecimento de limites seguros em humanos, e é feita uma revisão dos esforços regulamentares mais importantes que até à data foram concebidos a este respeito.

Como procedimento, foram realizadas pesquisas nas bases de indexação de publicações científicas PubMed e ScienceDirect, fazendo uso de termos como “pyrrolizidine alkaloids”, “toxicity”, “toxicology”, “genotoxicity”, “hepatotoxicity”, “carcinogenicity”, “hepatocarcinogenicity”, “tumorigenicity”, “DNA damage”, “liver”, “plants”, “herbal products”, “food safety”, “exposure” ou “risk assessment”, combinando-os entre si. Foi também seguido um método de referência cruzada entre os artigos mais significativos. Como referido anteriormente, a metodologia usada foi a de revisão bibliográfica.

Alcalóides e Alcalóides Pirrolizidínicos

Os alcalóides são compostos orgânicos de origem natural, quase exclusivamente vegetal, constituídos por carbono, hidrogénio, nitrogénio e, na maioria dos casos, também oxigénio. São um grupo bastante heterogéneo e de difícil categorização quanto à sua origem, estrutura química particular, biossíntese, bioquímica e efeitos tóxicos e farmacológicos (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Samuelsson, 1999).

Apesar de predominarem nas plantas, alguns podem ser encontrados em fungos e mesmo em bactérias (Evans, 2009). Por outro lado, também não são encontrados em todas as plantas, sendo mais frequentes, e até característicos, de famílias como as das *Solanaceae*, *Papaveraceae* ou *Fabaceae* (Samuelsson, 1999). Essencialmente, e de acordo com o entendimento tradicional do conceito, o termo *alcalóide* designa as estruturas nitrogenadas cíclicas, de carácter alcalino e origem predominantemente vegetal, capazes de uma significativa actividade farmacológica ou toxicológica (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Samuelsson, 1999).

Não obstante a sua característica química comum – a presença de azoto –, os alcalóides apresentam uma grande diversidade estrutural: para além dos protoalcalóides, caracterizados pelo azoto exocíclico, os verdadeiros alcalóides, heterocíclicos, são geralmente classificados segundo a natureza fundamental do heterociclo azotado. Refira-se, a título de exemplo, os alcalóides pirimidínicos, nos quais se reconhece o núcleo da piridina; os alcalóides indólicos, com o heterociclo penta-atómico do indol; os alcalóides quinoleicos e isoquinoleicos, derivados da quinoleína e isoquinoleína; e, naturalmente, os alcalóides pirrolizidínicos, caracterizados pelo núcleo da pirrolizidina.

Química dos Alcalóides Pirrolizidínicos

Estrutura e Biossíntese:

Estruturalmente, os PAs caracterizam-se pela presença de um núcleo pirrolizidínico, identificando-se este como uma estrutura bicíclica única de dois penta-anéis geminados e entre os quais se situa um azoto heterocíclico, o que lhes confere um carácter alcalino. Este núcleo, derivado da ciclização de aminas e devido a esse mesmo processo, pode apresentar variações

na sua estrutura fundamental, possuindo frequentemente um grupo hidroximetil ou hidroxilo em C1, bem como vários outros grupos hidroxilo ligados aos elementos do núcleo pirrolizidínico, particularmente em C7 mas também em C2 ou C6. A estas formas variantes é atribuído o nome de necinas, as quais constituem uma parte da estrutura dos PAs potencialmente activos (Fresno, del, 1999; Moreira *et al.*, 2018; Proença da Cunha, 2010; Röder, 2000; Roeder, 1995; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Relativamente à estrutura química das necinas, podem ser distinguidos quatro grupos-tipo de PAs mais importantes: Retronecina, Heliotridina, Otonecina e Platinecina (Moreira *et al.*, 2018). Os alcalóides do tipo platinecina são os únicos cuja estrutura é totalmente saturada, possuindo os restantes uma ligação dupla em C1-C2 (Moreira *et al.*, 2018; Neuman *et al.*, 2015). Sendo que a existência desta ligação insaturada é uma condição essencial para que se possa verificar a toxicidade dos PAs, os alcalóides do tipo platinecina não apresentam risco significativo para os organismos que com eles contactem (Fresno, del, 1999; Neuman *et al.*, 2015; Proença da Cunha, 2010; Samuelsson, 1999). Os do tipo otonecina distinguem-se pela metilação do seu nitrogénio, pela existência de um grupo carbonilo em C8 e por toda a necina ser uma estrutura monocíclica, em vez de bicíclica. No entanto, o seu comportamento químico é semelhante ao dos restantes PAs, devido à interacção electrónica entre o nitrogénio e o grupo carbonilo; apesar de não poderem formar N-óxidos (Allgaier e Franz, 2015; Wiedenfeld *et al.*, 2008). As estruturas nécicas do tipo retronecina e heliotridina são diastereómeros (Li *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018). De notar que ilustrações de todas as estruturas e reacções químicas mais importantes, no contexto dos PAs e sua toxicidade, e as quais são referidas ao longo deste documento, poderão ser encontradas em anexo ao mesmo.

Todos os PAs de actividade toxicológica reconhecida, ou que se encontram em plantas usadas pelas suas possibilidades terapêuticas, possuem os seus grupos hidroxilo de C7 e/ou C9 esterificados. Estas esterificações envolvem maioritariamente ácidos carboxílicos alifáticos, de quatro até dez carbonos e estrutura ramificada, designados por ácidos nécicos (Fresno, del, 1999; Mattocks, 1968; Mattocks e White, 1971; Moreira *et al.*, 2018; Röder, 2000; Roeder, 1995; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Alguns destes ácidos são dicarboxílicos, o que determina a possibilidade de formar ésteres macrocíclicos por esterificação dos dois hidroxilos da necina (Moreira *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 1999; Roeder, 1995; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Os ésteres de ácidos monocarboxílicos são moléculas relativamente pequenas, sendo característicos das Boragináceas; enquanto que os de ácidos dicarboxílicos são já moléculas de maiores dimensões, de onze a catorze membros, as quais são mais características das espécies de Asteráceas (Fresno, del, 1999; Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld *et al.*, 2008). A esterificação

das necinas por, no mínimo, um ácido néxico é considerada condição essencial para que os PAs possam demonstrar actividade toxicológica, bem como a existência de pelo menos uma ramificação na cadeia principal desse ácido (Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999). De forma menos comum, as necinas podem ainda ser esterificadas por ácidos aromáticos ou arilalquílicos (Moreira *et al.*, 2018).

A biossíntese das necinas é realizada através da descarboxilação de duas moléculas de ornitina, ou uma de arginina e uma de ornitina – a partir das correspondentes descarboxilases – com formação de duas moléculas de putrescina (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995; Samuelsson, 1999). A partir da espermidina, estas são depois condensadas numa imina, a qual é reduzida pela homospermidina sintase a homospermidina, considerada o primeiro composto intermediário específico da biossíntese dos alcalóides (Röder, 2000). Tanto a putrescina como a espermidina derivam exclusivamente da arginina, consistindo este precisamente o elo de ligação entre o metabolismo primário dos aminoácidos e as vias metabólicas de formação dos PAs (Röder, 2000). Subsequentes reacções de oxidação e redução e a reacção intramolecular de Mannich promovem a ciclização e transformam a homospermidina na necina pirrolizidínica (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995; Samuelsson, 1999). Já a biossíntese dos ácidos néxicos é menos homogénea que a das necinas, as suas múltiplas vias metabólicas permitindo mesmo uma grande variedade de estruturas possíveis (Moreira *et al.*, 2018; Roeder, 1995). A sua origem radica também no metabolismo dos aminoácidos, podendo derivar de moléculas como a valina, leucina, isoleucina e treonina (Fresno, del, 1999; Moreira *et al.*, 2018; Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995; Samuelsson, 1999).

Os PAs podem apresentar-se na forma de bases livres (com um nitrogénio terciário) ou, como é mais comum na sua ocorrência natural, na forma de N-óxidos, os quais não possuem carácter alcalino mas são extremamente hidrofílicos, sendo frequentemente encontrados sob a aparência de sais de ácidos orgânicos (Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld, 2011).

Ocorrência Natural

Calcula-se que, actualmente, o número de PA conhecidos se situe entre 400 e 650, tendo já sido encontrados em, pelo menos, 15 famílias vegetais, das quais 13 são de angiospérmicas, e

em mais de 350 espécies. No mínimo, 6 destas famílias produzem as formas insaturadas e esterificadas dos PAs, responsáveis pelos seus vários tipos de actividade e manifestações tóxicas (Allgaier e Franz, 2015; Fresno, del, 1999; Roeder, 1995; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Assim, estes podem ser encontrados com maior expressão na classe das dicotiledóneas, em particular nas plantas das famílias das *Asteraceae* (*Compositae*), *Boraginaceae* e *Fabaceae* (*Leguminosae*), existindo também, em menor quantidade, em algumas *Apocynaceae*, *Ranunculaceae* e *Scrophulariaceae* (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995; Samuelsson, 1999).

Os géneros em que se registam maiores concentrações destes alcalóides, dentro da família das *Asteraceae*, são os *Tussilago*, *Petasites* e, principalmente, o *Senecio*. Nas *Boraginaceae* existem em maior quantidade nas *Cynoglossum*, *Echium* e especialmente nas espécies de *Heliotropium*, *Borago* e *Symphytum*. Nas *Fabaceae*, o género *Crotalaria* é o que apresenta maior expressão de PAs (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010). Já os géneros mais comumente associados com casos de envenenamento e toxicidade, tanto em animais como em humanos, são os *Senecio*, *Eupatorium* e *Tussilago* (das asteráceas); os *Heliotropium* e *Trichodesma* (das boragináceas); e o *Crotalaria* (das fabáceas) (Allgaier e Franz, 2015; Li *et al.*, 2012; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Como então se pode notar, o grupo das *Asteraceae*, e em especial as do género *Senecio*, é aquele cujas plantas apresentam maiores concentrações de PAs e, simultaneamente, as mais associadas com episódios de intoxicação. Por causa disto, esta classe de alcalóides é também denominada de alcalóides do tipo *Senecio* (Proença da Cunha, 2010; Samuelsson, 1999).

Em apêndice deste documento é possível encontrar uma selecção de algumas das espécies produtoras de PAs que mais se notabilizaram pelo seu uso em contextos variados, bem como um enquadramento geral das suas utilizações terapêuticas tradicionais mais significativas.

Verifica-se, no geral, que apesar das utilizações destas plantas não serem motivadas pelo seu conteúdo em PAs e embora estes existam na maior parte das espécies, em quantidades francamente inferiores às dos restantes componentes fitoquímicos, a sua presença e perigosidade são frequentemente desconhecidas ou desvalorizadas pelos seus utilizadores; sendo, no entanto, suficientes para neles poderem provocar efeitos irreversíveis ou fatais.

À semelhança de muitos outros tipos de alcalóides, a biossíntese dos PAs ocorre maioritariamente nas raízes e rizomas, sendo depois transportados para a parte aérea das plantas, onde são armazenados em vacúolos celulares (Moreira *et al.*, 2018). No entanto, as suas maiores concentrações podem ainda ser encontradas nas partes subterrâneas (Allgaier e

Franz, 2015). É também importante ter em conta a variedade interindividual na produção de alcalóides, sendo que a sua concentração nas diversas partes da planta é influenciada por factores como a sua idade e as condições ambientais que esta encontra (Allgaier e Franz, 2015). Os PAs ocorrem naturalmente sob a forma de misturas de bases livres e de N-óxidos, sendo, no entanto, estes últimos que habitualmente predominam (Allgaier e Franz, 2015; Wiedenfeld, 2011).

Metabolismo, Mecanismo Geral de Toxicidade e Relação Estrutura/Actividade

A maior parte dos casos de contacto, consciente ou inadvertido, com os PAs são de carácter interno e pressupõem a sua ingestão e absorção por via gastrointestinal (Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Os PAs em si mesmos não apresentam actividade toxicológica, pelo que é necessária a sua bioactivação (Li *et al.*, 2012; Mattocks, 1968; Mattocks e White, 1971). À semelhança de muitos outros xenobióticos, para que se possa dar o seu efeito farmacológico ou tóxico ou para que possam ser mais eficientemente eliminados do organismo, é necessário que os PAs sejam biotransformados pelas vias metabólicas ocorrentes em várias estruturas, sendo, no entanto, o fígado o responsável pela maior fracção deste processo e, portanto, o órgão mais afectado pela toxicidade exercida pelos seus metabolitos (Chojkier, 2003; IPCS, 1988; Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Ainda assim, outros órgãos, como os pulmões ou os rins, podem também sofrer significativas alterações após a bioactivação decorrida no tecido hepático e transporte sanguíneo dos seus produtos (Chojkier, 2003; Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999). No entanto, cerca de 80% dos PAs ingeridos são eliminados na urina e fezes, sendo provável que possam também passar para o leite materno (EMA European Medicines Agency, 2014; Moreira *et al.*, 2018).

São três as principais vias de metabolização dos PAs do **tipo retronecina e heliotridina** (Fu *et al.*, 2001, 2004; Li *et al.*, 2012; Mattocks, 1968; Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008):

- **Hidrólise**, em C7 e/ou C9, com produção de necinas e ácidos néricos.
- **N-oxidação**, com formação de N-óxidos pirrolizidínicos.

- **C-oxidação**, por hidroxilação de C3 ou C8, com formação de derivados pirrólicos reactivos.

Já os PAs do **tipo otonecina** estão impossibilitados de sofrer N-oxidação de forma directa devido ao impedimento estereoquímico causado pelo grupo metil ligado ao nitrogénio heterocíclico, sendo por isso apenas duas as suas principais vias de metabolização (Fu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018; Roeder, 1995; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008):

- **Hidrólise**, em C7 e/ou C9, com produção de necinas e ácidos nélicos.

- **N-desmetilação oxidativa**, por oxidação do grupo metil e formação de derivados pirrólicos reactivos.

Vias de Destoxificação:

- Todos os produtos resultantes das modificações acima elencadas são potenciais substratos da GST (glutatião-S-transferase) nas suas reacções de conjugação com o glutatião, as quais têm o objectivo de proteger as estruturas celulares de danos oxidativos e facilitar a sua eliminação do organismo. A conjugação com o glutatião é, pois, considerada a principal via de destoxificação dos PAs (Allgaier e Franz, 2015; Fu *et al.*, 2001, 2004; Li *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 1999; Röder, 2000; Roeder, 1995; Wiedenfeld, 2011; Yang *et al.*, 2016). Não obstante, as hidrólises e N-oxidações são também importantes vias de destoxificação, dado que transformam moléculas potencialmente tóxicas em outras desprovidas dessa característica, ao mesmo tempo que dão origem a derivados mais polares e, portanto, mais solúveis e fáceis de transportar na corrente sanguínea e excretar por via renal. Adicionalmente, os seus produtos podem também vir a ser conjugados pelo glutatião (Allgaier e Franz, 2015; Fu *et al.*, 2001, 2004; Mattocks e White, 1971, 1971; Prakash *et al.*, 1999; Röder, 2000; Roeder, 1995; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

- A maioria dos PAs ingeridos sofre hidrólise dos seus grupos éster em C7 e/ou C9 durante ou imediatamente após a sua absorção gastrointestinal (Fresno, del, 1999; IPCS, 1988) por esterases não-específicas (Wiedenfeld *et al.*, 2008) ou, no fígado, através de carboxilesterases microsossomais ou citosólicas (Fu *et al.*, 2004), daí resultando a decomposição em necinas e ácidos nélicos (Fu *et al.*, 2004; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Em termos gerais, a toxicidade dos PAs é tanto maior quanto o número de grupos funcionais apresentados pela estrutura do núcleo pirrolizidínico, os quais provocam um impedimento estereoquímico à acção das

esterases. Deste modo, o potencial tóxico é maior na presença de um ou mais grupos hidroxilo na estrutura alcalóidica, bem como do hidroximetilo em C1. É maior também quanto mais esterificados forem e quanto mais extensas as ramificações das cadeias principais dos ácidos néicos (Mattocks e White, 1971; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008), sendo as necinas monoesterificadas as que apresentam menor toxicidade, aumentando esta para o caso das necinas duplamente esterificadas, embora ainda de cadeia aberta, e sendo máxima para as estruturas de diéster macrocíclicas (Allgaier e Franz, 2015; Fu *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2018; Röder, 2000; Xia *et al.*, 2006).

O estudo do comprimento das ligações químicas nos PAs através de uma análise estrutural pelo uso de raios-X revela as diferenças de estabilidade energética entre os alcalóides mais e menos esterificados, com influência na sua toxicidade (Wiedenfeld *et al.*, 2008). Verifica-se então que os diésteres apresentam ligações éster C7-O e C9-O mais curtas do que aquelas apresentadas pelos alcalóides monoesterificados. De acordo com uma interpretação, as funções éster dos diésteres encontram-se electronicamente conjugadas com a restante estrutura pirrolizidínica, em particular com a dupla ligação C1-C2, tornando assim o sistema mais instável no seu todo e fazendo com que a energia necessária para quebrar estas ligações (éster) seja menor. Isto facilitará a formação instantânea de metabolitos altamente reactivos, aumentando assim a sua proporção em relação às restantes vias de metabolização. Quanto às formas monoesterificadas, segundo uma leitura análoga, elas apresentam ligações éster electronicamente independentes da restante estrutura, sendo então mais estáveis; pelo que as reacções de transformação nos metabolitos reactivos se dão mais dificilmente, ocorrendo em menor proporção, em relação à hidrólise pelas esterases, e levando a uma eliminação facilitada dos PAs pelo organismo (Wiedenfeld *et al.*, 2008). Verifica-se, deste modo, a importância que a dupla ligação C1-C2 apresenta na efectivação da toxicidade dos PAs. Estas interpretações clarificam assim a relação essencial entre as particularidades da estrutura química dos PAs e o potencial toxicológico que lhes é atribuído pela observação clínica e laboratorial.

- As N-oxidações são levadas a cabo pelas enzimas hepáticas microssomais, dando origem a N-óxidos cujas estruturas apresentam elevada polaridade – sendo por isso mais facilmente excretáveis – e cujas estruturas de ressonância apresentam já o enfraquecimento da dupla ligação entre C1 e C2, com a consequente diminuição da instabilidade electrónica que esta confere e do potencial de bioactivação em metabolitos tóxicos (Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). No entanto, é ainda possível que os N-óxidos sofram reconversão aos correspondentes PAs originais, por redução através das enzimas hepáticas (Mattocks e White, 1971; Prakash *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2005; Wiedenfeld, 2011) ou gastrointestinais (Allgaier

e Franz, 2015; Mattocks e White, 1971; Wiedenfeld, 2011), ficando estes novamente sujeitos ao processo de bioactivação (Allgaier e Franz, 2015; Chou *et al.*, 2003; Mattocks e White, 1971; Wang *et al.*, 2005; Wiedenfeld, 2011). Por causa disto, a promoção da conversão a N-óxidos ou o tratamento exclusivo com estas formas não só não garantem a segurança dos indivíduos como podem até apresentar um perfil de toxicidade semelhante ao dos correspondentes PAs de base livre (Chou *et al.*, 2003; He *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2005, 2005; Wiedenfeld, 2011). Assim, apesar de considerada uma via de destoxificação, no caso dos seus produtos não sofrerem subseqüentes reacções de conjugação com o glutatião, a N-oxidação torna-se um processo de eficácia ambígua quanto à protecção à agressão dos PAs (Chou *et al.*, 2003, 2003; Wang *et al.*, 2005).

Vias de Bioactivação:

- A principal via de bioactivação dos PAs do tipo retronecina ou heliotridina a metabolitos tóxicos é a C-oxidação do núcleo da estrutura através da hidroxilação dos carbonos C3 ou C8 (adjacentes ao nitrogénio heterocíclico), a qual se dá principalmente através das enzimas hepáticas microsossomais (Fu *et al.*, 2001, 2004; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Os produtos resultantes são metabolitos intermédios de estrutura carbinolamina, altamente instáveis, que rapidamente sofrem desidratação do núcleo pirrolizidínico e um rearranjo electrónico, de forma a darem origem ao metabolito primário activamente tóxico dos PAs. Esta estrutura é um derivado didehidropirrolizidínico (também chamada dihidropirrolizina ou, genericamente, de éster pirrólico, por apresentar um anel semelhante ao dos alcalóides pirrolidínicos) e apresenta-se como um sistema aromático “pirrólico”, electronicamente conjugado no seu núcleo entre as duas duplas ligações que possui e o átomo de nitrogénio heterocíclico (Allgaier e Franz, 2015; Fu *et al.*, 2004; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Assim, os electrões pertencentes anteriormente ao átomo de nitrogénio encontram-se agora deslocalizados na estrutura deste derivado, perdendo-se o carácter alcalino do mesmo; o que leva alguns autores a deixarem já de considerar estes metabolitos como alcalóides (Wiedenfeld *et al.*, 2008). Estes sistemas reagem facilmente em ambientes acídicos com a perda dos seus ácidos néricos e subseqüente rearranjo electrónico, dando origem a carbocatiões pirrólicos de carácter altamente electrofílico que, instantaneamente, reagem com diversas estruturas celulares nucleofílicas. Deste modo, podem ligar-se a grupos hidroxilo, amina e sulfidril de proteínas, bem como formar aductos com as bases púricas e pirimidínicas das cadeias de RNA e DNA, promovendo

diversos tipos de dano celular e molecular e assim dando origem a diversas manifestações tóxicas, genotóxicas e carcinogénicas (Fresno, del, 1999; Fu *et al.*, 2001, 2004; IPCS, 1988; Li *et al.*, 2012; Mattocks, 1968; Mattocks e White, 1971; Prakash *et al.*, 1999; Röder, 2000; Roeder, 1995; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Como um passo importante em todo este processo é a perda da porção molecular correspondente aos ácidos néricos, de forma a que se dê a formação dos carbocatiões, verificam-se diferenças de toxicidade para alcalóides com diferentes níveis de esterificação. Geralmente os que se apresentam como diésteres macrocíclicos possuem maior capacidade para alquilar duplamente as estruturas celulares (*cross-linking*) do que aqueles que apenas apresentam um centro reactivo capaz de o fazer (C7 ou C9), os quais mais dificilmente provocam a mesma extensão de lesões (Fu *et al.*, 2001, 2004; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008; Xia *et al.*, 2006). Para além disso, o centro reactivo em C7 reage mais fácil e rapidamente do que o de C9, podendo isto também manifestar-se na sua toxicidade (Kim *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

- Também os PAs do tipo otonecina podem gerar estes derivados didehidropirrolizidínicos, altamente reactivos, através de um processo de N-desmetilação oxidativa. Este consiste na oxidação do grupo metil ligado ao nitrogénio heterocíclico, o qual abandona a molécula na forma de formaldeído, com formação de um grupo amina no anel alcalóidico. Dá-se de seguida uma condensação entre a cetona em C8 e o grupo amina, levando ao fechamento dos anéis do núcleo pirrolizidínico com conseqüente desidratação e formação do sistema aromático pirrólico (Fu *et al.*, 2004; Roeder, 1995; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

- Uma vez formados, os derivados reactivos didehidropirrolizidínicos podem sofrer dois tipos principais de metabolização: conjugação com o glutatião (uma via de destoxificação envolvendo a GST, análoga às que ocorrem para os compostos anteriores aos derivados pirrólicos); e hidrólise não-enzimática dos ácidos néricos (a qual resulta na formação de um metabolito tóxico secundário). Esta segunda reacção ocorre espontaneamente em meio aquoso, originando estruturas designadas dehidronecinas, as quais apresentam o mesmo núcleo aromático reactivo dos derivados anteriores, mas são desprovidas das funções éster em C7 e C9 e correspondentes ácidos néricos. Por causa disso, as dehidronecinas retêm uma importante actividade alquilante, deixando, porém, de apresentar a mesma facilidade de formação dos carbocatiões electrofilicos que os ésteres pirrólicos denotavam, dado que, em ambiente ácido, os ácidos néricos se tornavam bons *leaving-groups*. No entanto, apesar da diminuição da reactividade, as dehidronecinas podem ainda actuar do mesmo modo que os ésteres dos quais provêm, dando origem aos carbocatiões por desidratação e perda dos seus

grupos hidroxilo em C7 e/ou C9. Deste modo, a via da hidrólise dos derivados pirrólicos primários (ésteres) resulta na formação de derivados pirrólicos secundários (álcoois) – os quais também são tóxicos, mas que apresentam um diferente perfil de actividade (Fu *et al.*, 2004; IPCS, 1988; Röder, 2000; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Adicionalmente, as dehidronecinas são compostos mais polares e mais solúveis em água, podendo isso facilitar a sua eliminação, por um lado, mas também promover, em virtude da sua menor reactividade, a que sejam transportados até outros órgãos e tecidos que não o fígado para aí exercerem os seus mecanismos de toxicidade (Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Existe inclusivamente a possibilidade de alguns aductos já constituídos poderem reverter, por clivagem das suas ligações, e assim levar à formação de dehidronecinas, as quais, deste modo, constituem um risco constante de toxicidade em vários tecidos, mesmo após meses desde a cessação do contacto com a fonte dos alcalóides. Por tudo isto, as dehidronecinas são consideradas particularmente responsáveis pelos efeitos mais tardios ou crónicos da toxicidade dos PAs, entre os quais estão as várias manifestações de mutagenicidade e carcinogenicidade em diferentes tecidos como o fígado, pulmões, pele, rins, glândulas supra-renais, bexiga, entre outros (Allgaier e Franz, 2015; Chen, Mei e Fu, 2010; Edgar *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2004; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999; Röder, 2000; Wiedenfeld *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016). Tal como os compostos anteriores, também as dehidronecinas podem vir a sofrer conjugação com o glutatião, assim facilitando a sua eliminação do organismo (Prakash *et al.*, 1999).

É importante notar que, para que estas vias de bioactivação e a formação de ésteres e álcoois pirrólicos reactivos se possam dar, é necessário que o alcalóide original seja insaturado em C1-C2, de forma a que se possa produzir por esta via uma estrutura aromática electronicamente conjugada entre as duas duplas ligações dos derivados activos. Esta particularidade estrutural dos PAs é, pois, condição essencial para que se possa realizar a actividade toxicológica deste grupo de compostos (Allgaier e Franz, 2015; Fresno, del, 1999; Mattocks e White, 1971; Prakash *et al.*, 1999; Proença da Cunha, 2010; Samuelsson, 1999; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Tem-se observado que, pelo menos alguns dos PAs de estrutura saturada, do tipo platinecina, hastonecina, rosmarinecina e isoretronecanol, dão origem, após metabolização hepática, a derivados pirrólicos com um anel B aromático (ao invés do anel A adjacente, dos PAs 1,2-insaturados). No entanto, estes são desprovidos da reactividade alquilante que caracteriza os anteriores, não apresentando actividade hepatotóxica ou carcinogénica (Mattocks e White, 1971; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

De notar ainda que a velocidade da reacção de formação dos carbocatiões a partir dos derivados didehidropirrolizidínicos (e associada à das subsequentes reacções com as estruturas nucleofílicas), assim como a proporção da formação destes produtos, em relação aos das outras vias metabólicas concorrentes (hidrólises, N-oxidação e conjugação com o glutatião – tidas como vias de destoxificação), são os dois factores mais marcantes e determinantes da toxicidade dos PAs, a nível da sua química fundamental (Li *et al.*, 2012). São também importantes para explicar a diferente susceptibilidade existente entre espécies e entre indivíduos de uma mesma espécie, em relação ao potencial tóxico destes alcalóides (Fu *et al.*, 2001, 2004; Li *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 1999; White, Mattocks e Butler, 1973; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

O grupo das enzimas hepáticas pertencentes ao citocromo P450 (CYP) reúne as principais enzimas envolvidas nos processos de metabolização dos PAs, seja nas hidrólises por carboxilesterases, nas N-oxidações, N-desmetilações oxidativas ou na formação dos derivados didehidropirrolizidínicos por C-oxidação. As sub-famílias CYP3A e CYP2B são as mais directamente envolvidas no processo de bioactivação, particularmente as isoenzimas CYP3A4 e CYP2B6 (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; Fu *et al.*, 2004; Koleva *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld, 2011). A alteração da actividade das enzimas metabolizantes de fase I e/ou de fase II, bem como da expressão dos genes que as codificam – seja pelos próprios alcalóides, por outros compostos activos existentes nas misturas herbais complexas ou pelo uso de medicação concomitante –, pode aumentar ou diminuir significativamente a fracção de bioactivação dos PAs, influenciando assim na severidade das manifestações tóxicas destes compostos (Fu *et al.*, 2004; Gordon, Coleman e Grisham, 2000).

Caracterização da Toxicidade e suas Manifestações

É vasta a gama de manifestações tóxicas provocadas pelos PAs. Considerando os efeitos a nível molecular, e tendo em conta os órgãos afectados, tem sido estabelecida a sua responsabilidade em manifestações de genotoxicidade (Chen, Mei e Fu, 2010; Coulombe, Drew e Stermitz, 1999; Fu *et al.*, 2001, 2004; He *et al.*, 2017; Hong *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2003), mutagenicidade (Chen, Mei e Fu, 2010; Frei *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2003; Mei *et al.*, 2005, 2004), teratogenicidade (Chen, Mei e Fu, 2010; Edgar, Molyneux

e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Koleva *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld *et al.*, 2008), carcinogenicidade (Chan *et al.*, 2003; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Fu *et al.*, 2001, 2004; Harris e Chen, 1970; Hirono *et al.*, 1979; IPCS, 1988; Mattocks e Cabral, 1982), hepatotoxicidade (Allgaier e Franz, 2015; Bunchorntavakul e Reddy, 2013; Chojkier, 2003; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Fu *et al.*, 2004; IPCS, 1988; Koleva *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2013; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016), pneumotoxicidade (Chojkier, 2003; Edgar *et al.*, 2011; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Koleva *et al.*, 2012; Prakash *et al.*, 1999), cardiotoxicidade (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Koleva *et al.*, 2012), nefrotoxicidade (IPCS, 1988) e neurotoxicidade (IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 2018), entre outras.

Genotoxicidade:

Sendo o mecanismo geral de toxicidade dos PAs a formação de aductos envolvendo proteínas e/ou DNA, os efeitos genotóxicos destas moléculas são, pois, virtualmente transversais a toda a gama de efeitos específicos e localizados que estas possam apresentar nos diferentes órgãos-alvo. Estudos iniciais no âmbito do esclarecimento mecanístico na promoção e desenvolvimento de tumores provocados pela ridelina verificaram uma correlação significativa entre a formação de aductos de DNA pelos derivados didehidropirrolizidínicos e o potencial carcinogénico imputado experimentalmente a diferentes concentrações deste alcalóide (Chou *et al.*, 2003, 2003; Fu *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2001). Para além disto, observou-se que a formação destes aductos se dá com maior expressão nos núcleos das células do endotélio sinusoidal hepático do que nas células do parênquima hepático, o que se relaciona positivamente com o facto de aquelas constituírem a origem dos hemangiosarcomas, por sua vez, a manifestação carcinogénica mais específica da ridelina (Chan *et al.*, 2003; Chou *et al.*, 2003). Tendo em conta o paralelismo que pode ser estabelecido entre o sistema hepático microsomal do humano e o dos roedores usados experimentalmente, bem como a similar formação de aductos em ambos, é, pois, expectável uma relevância semelhante destes mecanismos na potencial carcinogenicidade provocada pela ridelina e outros PAs em seres humanos (Chou *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2003). Deste modo, dada a indução de tumores hepáticos em roedores pela ridelina e o facto de os aductos de DNA formados pelos seus derivados metabólicos serem responsáveis pela promoção de tumores hepáticos, os resultados obtidos sugerem fortemente que a ridelina possa ter um efeito genotóxico em humanos por via da formação de aductos de DNA. Desde então, tem sido construído um considerável acervo de estudos *in vitro* e *in vivo* cuja evidência fundamenta a acção genotóxica destes alcalóides, particularmente através de dano primário nas cadeias de

DNA, por via da formação de um mesmo tipo de aductos de DNA a partir de diferentes tipos de PAs, como a já referida ridelina, a retrorsina, monocrotalina, lasiocarpina, heliotrina ou a clivorina, bem como de extractos complexos de preparações vegetais tradicionais e de suplementos alimentares (Chou *et al.*, 2003; Chou e Fu, 2006; Coulombe, Drew e Stermitz, 1999; Fu *et al.*, 2001, 2004; Wang *et al.*, 2005; Wang, Fu e Chou, 2005; Xia *et al.*, 2008, 2003, 2004, 2006). Estes aductos têm também sido apontados como potenciais biomarcadores para a determinação da exposição a estes alcalóides por via da dieta, para a presença dos mesmos nos tecidos de diferentes órgãos e como adjuvantes na identificação e caracterização de patologias específicas destas moléculas, como sejam as formas de progressão de doença hepática e formação de tumores associados ao seu consumo. O potencial de utilização destas estruturas como biomarcadores é confirmado pela sua presença em relação linear proporcional à exposição e concentração dos PAs, assim como pela sua estabilidade, persistência e especificidade para as patologias que lhes estão associadas; daí que possam ser usados para prever e monitorizar estas situações, nomeadamente a presença e progressão das alterações hepáticas (Chen, Mei e Fu, 2010; Fu *et al.*, 2004; He *et al.*, 2017; Kakar *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018; Xia *et al.*, 2006).

Os derivados didehidropirrolizidínicos frequentemente possuem, como ficou dito, dois centros reactivos, em C7 e em C9 (Fu *et al.*, 2004; Prakash *et al.*, 1999), sendo então possível a formação de ligações covalentes com um ou dois nucleófilos em simultâneo nestes locais da molécula do carbocatião. Estas situações levam à disrupção funcional das estruturas envolvidas e a um impedimento estereoquímico ainda maior, sendo assim caracterizadas pela formação de ligações cruzadas, comumente referidas como *cross-linking*. Apresentando-se as interacções com proteínas e com o DNA como as mais relevantes para a toxicologia dos PAs, é importante notar a ocorrência significativa de *crosslinks* entre ambos (DNA-proteínas – constituindo cerca de 50% do total de *crosslinks* celular (Coulombe, Drew e Stermitz, 1999)), bem como entre duas bases nitrogenadas da mesma cadeia de DNA (*crosslinking* intracadeia), entre bases pertencentes a cada cadeia de DNA (*crosslinking* intercadeia) e entre proteínas apenas, nomeadamente enzimas e outras, não só estruturalmente importantes mas funcionalmente essenciais à dinâmica molecular (Chen, Mei e Fu, 2010; Kim *et al.*, 1999; Kim, Stermitz e Coulombe, 1995). Embora estrutural e mecanisticamente semelhantes aos aductos simples, os *crosslinks* derivados de carbocatiões bifuncionais denotam um perfil toxicológico diferente, pois aqueles induzem principalmente mutações genéticas, enquanto estes tendem a induzir mutações cromossomais. O facto de alguns PAs serem apenas monoesterificados, e, portanto, incapazes de formar derivados pirrólicos com dois centros reactivos, faz com que

estes não possam ligar-se por *crosslinking*, possuindo assim um diferente perfil de toxicidade em comparação com aqueles que o podem fazer (ex.: ésteres do tipo supinidina, em relação aos do tipo retronecina ou heliotridina). No geral, as diferenças de reactividade entre PAs, no que toca à formação de *crosslinks*, são devidas às diferenças de impedimento esteroquímico que estes podem apresentar. Também aqui, portanto, os diésteres macrocíclicos se apresentam como os mais potentes agentes de ligação cruzada. Em suma, estudos de determinação da potência relativa de *crosslinking* para diferentes PAs coincidem com o potencial de toxicidade que lhes é genericamente atribuído por outros estudos com diferentes *endpoints* (Chen, Mei e Fu, 2010; Coulombe, Drew e Stermitz, 1999; Kim *et al.*, 1999; Kim, Stermitz e Coulombe, 1995; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Tanto os aductos simples como os *crosslinks* têm como possíveis efeitos a disrupção metabólica e interrupção do ciclo de vida celular (efeito necrótico e/ou apoptótico), a origem e reprodução de mutações genéticas com consequências diversas ou a indução e transmissão de danos genéticos estruturais passíveis de iniciar processos cancerígenos (Chen, Mei e Fu, 2010; Fu *et al.*, 2001, 2004; IPCS, 1988; Mattocks e Cabral, 1982; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

Outros métodos de estudo relativos à expressão da genotoxicidade dos PAs a nível molecular são a medição da frequência de ocorrência de fracturas nas cadeias de DNA e o teste da UDS (*Unscheduled DNA Synthesis*). Os resultados têm-se mostrado contraditórios e incertos quanto à capacidade dos PAs para provocarem fracturas nas cadeias simples de DNA, dependendo os mesmos do tipo de metodologia de estudo usada para efectuar estas medições, sendo que podem apresentar sensibilidades bastante diferentes entre si. No entanto, alguns estudos mais recentes apontam para um significativo efeito de dose-resposta na quebra das cadeias de DNA para alguns PAs (Chen, Mei e Fu, 2010). Já o teste de UDS quantifica a síntese de DNA como efeito de reparação, após a excisão de uma porção de material genético modificado por agentes causadores de dano estrutural primário de DNA, neste caso através dos aductos causados pelos PAs. Resultados de diversos estudos têm demonstrado significativos aumentos na UDS, relacionados com diferentes concentrações de PAs, nomeadamente no respeitante à ridelina, senecionina, retrorsina e senecifilina (Chen, Mei e Fu, 2010).

Já a nível celular e citogenético, o foco dos estudos de genotoxicidade passa pela observação do estado e interacção dos cromossomas entre si, através da verificação da ocorrência de mutações cromossómicas, e da disposição destes na célula. Testes comuns neste âmbito são a verificação da indução de micronúcleos em células, durante ou após o processo de divisão; a observação de aberrações cromossómicas; ou a medição da frequência de trocas de material genético entre cromátideos-irmãos (SCE – *Sister Chromatid Exchange*). A designação de

micronúcleos é dada a cromossomas ou fragmentos de cromossomas envoltos numa membrana nuclear, durante a mitose ou meiose que, de forma disfuncional, não seguiram o seu curso para a célula-filha. Deste modo, estas estruturas formam como que pequenos núcleos disfuncionais e são marcadores de dano provocado por agentes genotóxicos. A este respeito, os PAs têm demonstrado claramente serem fortes agentes clastogénicos, induzindo o aparecimento de micronúcleos em hepatócitos e eritrócitos, em particular a integerrimina, retrorsina, heliotrina, monocrotalina e isatidina (Chen, Mei e Fu, 2010). Tem sido também verificado através de diversos estudos, realizados ao longo de vários anos, que alguns PAs induzem significativamente o aparecimento de aberrações cromossómicas, nomeadamente através de trocas intercromossómicas e de deleção de partes dos mesmos, ainda que nos resultados possam influir condições como as linhas celulares usadas e os sistemas de activação escolhidos. Deste modo, verifica-se a genotoxicidade de PAs como a ridelina, heliotrina, lasiocarpina, petasitenina, senquirquina, monocrotalina ou a integerrimina (Chen, Mei e Fu, 2010). No que diz respeito aos cromátídeos-irmãos – entidades virtualmente idênticas quanto ao seu conteúdo -, as trocas de material genético entre os mesmos têm sido associadas a um risco aumentado de dano cromossómico e indução de tumores. Testes de SCE têm demonstrado que muitos PAs são promotores destes eventos genéticos, como a ridelina, heliotrina, monocrotalina, senecifilina e senquirquina (Chen, Mei e Fu, 2010), sendo que aqueles com capacidade para formar derivados pirrólicos bifuncionais são melhores indutores de SCE (IPCS, 1988).

Mutagenicidade:

Diferentes sistemas e desenhos de testes experimentais têm sido usados na determinação da capacidade dos PAs em originar mutações genéticas. De entre os mais comuns estão aqueles em que, devido à sua simplicidade e facilidade de manipulação, são testados diferentes alcalóides em culturas bacterianas, particularmente em diversas estirpes de *Salmonella typhimurium*, normalmente associadas e precedidas de um sistema de activação microssomal (Chen, Mei e Fu, 2010; Fu *et al.*, 2004). No entanto, resultados contraditórios têm levado a que se considerem alguns destes sistemas insuficientemente sensíveis, se não associados a um sistema de activação hepático adequado (Rubiolo *et al.*, 1992).

Devido a isto, têm sido preferidos os sistemas de teste que fazem uso da *Drosophila melanogaster*, comumente designada de mosca da fruta (Chen, Mei e Fu, 2010; Fu *et al.*, 2004). Estes adequam-se melhor aos ensaios com PAs, não só devido à semelhança entre as vias metabólicas gerais da *Drosophila* e as dos mamíferos, mas também ao seu versátil sistema de

bioactivação e à elevada sensibilidade a agentes de *cross-linking*, bem como a um elevado nível de ortologia (correspondência entre grupos de genes com a mesma função biológica entre espécies distintas) de uma parte do seu genoma, em relação com o dos humanos. Dois dos testes *in vivo* mais comuns são o SLRL (Sex-Linked Recessive Lethal Assay), um teste mutagénico sensível e adequado aos PAs, que se correlaciona bem com a actividade carcinogénica conhecida para cada um; e o SMART (Somatic Mutation and Recombination Test), o qual tem por base, principalmente, a observação fenotípica dos olhos ou das asas (referido comumente por *Wing Spot Test*) (Candrian *et al.*, 1984; Chen, Mei e Fu, 2010; Fu *et al.*, 2004). Heliotrina, senecifilina, senquirquina e monocrotalina foram determinados como mutagénicos, de acordo com o teste de SLRL, enquanto a integerrimina testou positivo para o *Wing Spot Test* (Candrian *et al.*, 1984; Chen, Mei e Fu, 2010; Fu *et al.*, 2004). Num estudo em que 16 PAs foram submetidos a este teste, foi possível verificar o potencial mutagénico deste grupo de compostos e relacioná-lo com a estrutura particular de cada um (Frei *et al.*, 1992). Os resultados confirmam aquilo que tem sido estabelecido quanto ao potencial toxicológico geral dos PAs (genotóxico ou carcinogénico): todos os PAs testaram positivo, com excepção da supinina, cabendo à senquirquina, monocrotalina, senecifilina e senecionina as maiores respostas mutagénicas. Em linha com outros estudos, portanto, estabelece-se também aqui uma maior potência genotóxica para os PAs que apresentam uma estrutura de diéster macrocíclico, diminuindo esta para os PAs duplamente esterificados mas de cadeia aberta e apresentando-se mínima para os monoesterificados, sendo a lipofilia um factor que favorece a actividade mutagénica (Frei *et al.*, 1992; Fu *et al.*, 2004).

Mais recentemente tem aumentado a preferência pelo uso de roedores, em particular ratos transgénicos, dado que estes podem facilitar o estudo específico da acção sobre um tecido-alvo e outros trabalhos quantitativos e qualitativos a partir daí (Chen, Mei e Fu, 2010). Neste âmbito, são de especial importância a medição da frequência de mutações provocadas pelos PAs em determinados genes e a determinação e caracterização do tipo mais frequente dessas mutações. A este respeito verifica-se um aumento significativo da frequência de mutações no gene *cil* dos tecidos tratados com PAs. Verifica-se ainda que os aductos induzidos pela ridelina e outros PAs no gene *cil* do fígado de ratos se dão preferencialmente em pares de bases G:C, com maior reactividade para os nucleótidos de guanina. Entre os tipos de mutações promovidas pela formação de aductos neste par de bases, as de expressão mais significativa são a transversão G:C→T:A e as substituições de base em tandem GG→TT e GG→AT, provavelmente originadas a partir de *crosslinks* intracadeia em regiões de guanosinas adjacentes. Assim, uma prevalência deste tipo de mutações pode constituir um biomarcador

molecular para a determinação da exposição aos PAs ou, pelo menos, um padrão mutagénico característico da sua genotoxicidade (Chen, Mei e Fu, 2010; Chou *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2004; Mei *et al.*, 2005, 2004).

Em conclusão, a actividade mutagénica dos PAs afigura-se genericamente como um resultado diretamente proporcional à concentração dos mesmos, sendo esta mediada pela formação de aductos entre o DNA e os seus metabolitos didehidropirrolizidínicos, resultando em dano genético a nível molecular e cromossómico e em mutações potencialmente indutoras de processos carcinogénicos.

Teratogenicidade e Fetotoxicidade:

Apesar da maioria dos PAs apresentar uma estrutura de carácter maioritariamente polar, o que lhes possibilita dissolverem-se em água e nas misturas aquosas orgânicas, pensa-se que alguns destes compostos possam apresentar uma maior lipofilia, assim permitindo-lhes, por exemplo, serem mais facilmente transportados através da barreira placentar (Prakash *et al.*, 1999). A maior parte deles, no entanto, deverá apresentar esta capacidade de forma parcial e, embora relativamente raros, existem registos de casos, na literatura científica, de observação de manifestações de intoxicação hepática por PAs em fetos e recém-nascidos cujas mães teriam consumido plantas, ou extractos das mesmas, contendo estes compostos; ainda que estas não apresentassem qualquer sintoma (Rasenack *et al.*, 2003; Roulet *et al.*, 1988). A justificação para a ocorrência destes casos consiste precisamente na capacidade de alguns PAs em atravessar a placenta, por um lado, e/ou em poderem solubilizar-se e serem transmitidos pelo leite materno, por outro (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Mattocks e White, 1973). Durante o desenvolvimento fetal, e quase até ao momento do nascimento, o fígado do bebé não tem a capacidade de metabolizar os PAs, pelo que manifestações tóxicas que se criam originadas nesta fase têm necessariamente de advir da transmissão transplacentar dos derivados pirrólicos formados no fígado materno. A partir daí, porém, o desenvolvimento do recém-nascido começa a permitir a metabolização hepática, o que o torna altamente susceptível ao contacto com PAs, em particular através da amamentação. Assim, o embrião *in utero* aparenta ser mais resistente que o recém-nascido aos efeitos tóxicos dos PAs (Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; Mattocks e White, 1973).

Estudos realizados em ratos no decurso da sua segunda semana de gestação demonstram o efeito dos PAs em atrasar o desenvolvimento fetal e na indução de deformações musculoesqueléticas no feto, como a ossificação retardada ou de morfologia alterada, sendo a gravidade das mesmas a ser determinada pela concentração das doses aplicadas, com a morte

intra-uterina como consequência final deste efeito. Embora a exposição a PAs por parte de ratos em gestação nem sempre seja uma garantia da observação de manifestações hepatotóxicas nos fetos e recém-nascidos, existe evidência significativa de que estes compostos podem levar à ocorrência de partos prematuros, provocar efeitos teratogênicos e fetotóxicos e causar morte fetal intra-uterina (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; Wiedenfeld *et al.*, 2008).

Carcinogenicidade:

Não existem, até à data, relatos de casos oncológicos em humanos de causalidade inequivocamente estabelecida em relação à exposição a PAs, nem informação decorrente de monitorizações a longo prazo de populações humanas expostas a PAs e sua potencial relação com a incidência cancerígena nas mesmas. No entanto, múltiplos estudos experimentais em animais têm demonstrado que vários PAs possuem uma acção carcinogénica nos mesmos, entre os quais estão a monocrotalina, heliotrina, lasiocarpina, clivorina, petasitenina e ridelina [29 da Moreira]. Diversos destes compostos foram já considerados pela IARC (*International Agency for Research on Cancer* – Agência Internacional de Investigação para o Cancro) e categorizados ou no Grupo 2B, “possivelmente carcinogénico em humanos”, ou no Grupo 3, “não classificável como carcinogénico em humanos”. Esta concluiu que existia, nos estudos experimentais em animais, suficiente evidência para a classificação de alguns PAs a este respeito, bem como de extratos de diversas plantas contendo estes alcalóides. Porém, a classificação foi inicialmente conservadora, colocando muitos no Grupo 3, tendo depois sido reavaliados e colocados no Grupo 2B a ridelina, lasiocarpina e monocrotalina (Allgaier e Franz, 2015; COT Committee on toxicity, 2008; EMA European Medicines Agency, 2014). No Grupo 3 ficaram a isatidina, retrorsina e a senquirquina (Koleva *et al.*, 2012).

Ainda que se constate difícil uma determinação definitiva de evidência causal entre a exposição a PAs e a indução de tumores em humanos, as bases da mesma encontram-se já relativamente estabelecidas pela conjugação de diferentes tipos de conhecimento, resultantes de estudos de natureza e abordagem diversa. Desde logo, através do relato e descrição, na literatura, de casos clínicos relacionando o contacto com PAs, inclusive voluntário, com a presença de tumores hepáticos (a forma mais comum de carcinogenicidade causada pelos mesmos) em determinadas populações específicas. Assim, verifica-se que à elevada ocorrência de casos de carcinoma hepático primário em indivíduos de comunidades centro- e sul-africanas, com forte tradição na utilização de produtos medicinais artesanais à base de plantas contendo PAs, tem sido reconhecidamente imputada uma relação de causalidade para com a exposição a estes

compostos (Culvenor, 1983; Pavlica e Samuel, 1969; Schoental, 1968). Outro corpo de estudos que contribui directamente para o estabelecimento da importância e responsabilidade dos PAs na carcinogenicidade é composto pelas investigações laboratoriais realizadas em animais experimentais, maioritariamente em ratos. Alguns dos compostos usados nestes estudos e, portanto, tidos como carcinogénicos nos testes efectuados, são a ridelina, muitas vezes tomada como modelo dos PAs, senquirquina, sinfitina, o derivado pirrólico dehidroheliotridina ou os alcalóides contidos em extractos de *Senecio spp.* (Chan *et al.*, 2003; Culvenor, 1983; Harris e Chen, 1970; Hirono *et al.*, 1979; Mattocks e Cabral, 1982; Peterson *et al.*, 1983). Quer façam uso de extractos de plantas que contenham PAs, dos próprios alcalóides isolados ou dos seus derivados, estes trabalhos têm demonstrado a carcinogenicidade destes agentes em diversos órgãos e tecidos: particularmente e de forma mais frequente no fígado (sob a forma de carcinoma hepatocelular e de hemangiosarcomas), mas também nos pulmões, cérebro, medula espinal, pele, bexiga, rins, glândulas supra-renais, tracto gastro-intestinal, pâncreas e ossos, entre outros (Chen, Mei e Fu, 2010; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Moreira *et al.*, 2018). Independentemente do desenho dos testes e dos seus objectivos específicos, estes estudos têm permitido verificar e estabelecer uma relação de causalidade entre a exposição a diversos PAs e o desenvolvimento efectivo de tumores em vários tecidos dos animais usados. Por fim, encontram-se os estudos de carácter genotóxico que fazem uso dos PAs já tidos como carcinogénicos em animais, de forma a relacioná-los positivamente com os resultados dos testes e mecanismos de genotoxicidade e mutagenicidade atrás descritos; assim como aqueles que relacionam os mecanismos de toxicidade dos PAs nos animais e nos humanos, aproximando-os. Estes fornecem uma base de racionalidade que permite fazer a ligação entre a acção mecanística química e bioquímica dos PAs e o seu provável efeito carcinogénico nos humanos (Chou *et al.*, 2003, 2003; Chou e Fu, 2006; Fu *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005; Wang, Fu e Chou, 2005; Xia *et al.*, 2003). Deste modo, estabelece-se a hipótese de trabalho, cujas forças empírica e racional provêm simultaneamente de diferentes fontes e que é permanentemente reforçada por nova evidência: de que os PAs são compostos tóxicos com um mecanismo de acção que passa pela formação de aductos com proteínas e DNA, levando à ocorrência de danos estruturais nas células e tecidos e a mutações genéticas e cromossómicas responsáveis pela indução de processos carcinogénicos em humanos.

Hepatotoxicidade:

São geralmente considerados agentes hepatotóxicos directos aqueles compostos capazes de efectivar uma acção sobre a secreção biliar, provocando a colestase, mas sem

significativamente impactarem o parênquima hepático. Já os agentes hepatotóxicos indirectos são aqueles passíveis de provocar dano hepático através de disrupções metabólicas ou fisiológicas, actuando principalmente sobre o parênquima do fígado. Estes podem competir com metabolitos fundamentais à manutenção da homeostase, levando a alterações extensas do mapa metabólico, ou alterar a estrutura bioquímica de componentes essenciais a nível molecular e celular, dando origem a processos patológicos. Os PAs fazem parte deste último grupo, das hepatotoxinas indirectas, ao actuarem através da alquilação de estruturas fundamentais e consequente formação de aductos com as mesmas (Neuman *et al.*, 2015). Assim, independentemente da variação estrutural que os PAs indubitavelmente apresentam, todos eles efectivam a sua carcinogenicidade ou hepatotoxicidade a partir de um mesmo processo de activação metabólica (dando origem a derivados pirrólicos reactivos) e de mecanismos de acção análogos (através da formação de aductos, respectivamente, com o DNA e com as proteínas do tecido hepático) (Chojkier, 2003; Li *et al.*, 2012; Mattocks, 1968; Prakash *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 2006). A este respeito, é interessante notar, no entanto, que a actividade carcinogénica dos PAs aparenta relacionar-se de forma proporcional com o seu comportamento mutagénico, mas não com a sua potência hepatotóxica (Chen, Mei e Fu, 2010; EMA European Medicines Agency, 2014; Fu *et al.*, 2004; IPCS, 1988), o que provavelmente reflete a necessidade de mecanismos genotóxicos e de fixação e proliferação mutagénica para o desenvolvimento dos processos cancerígenos associados aos PAs, por um lado, e a maior independência do processo hepatotóxico em relação aos mecanismos genéticos, por outro. No geral, a hepatotoxicidade dos PAs dá-se de acordo com os níveis de reactividade determinados pelas suas particularidades estruturais, já descritas, tendo um estudo de *screening in vitro* determinado que esta se apresenta mais expressiva para os PAs do tipo otonecina, seguindo-se os do tipo retronecina e sendo mínima para aqueles cujas necinas sejam do tipo platifilina (Li *et al.*, 2013).

É possível identificar cinco vias fundamentais da actuação toxicológica dos PAs a nível celular e molecular, processos responsáveis no seu conjunto pelo desenvolvimento total da sua hepatotoxicidade:

- **Alquilação de proteínas, enzimas e outras estruturas fundamentais.** Decorre daqui a perda de função das mesmas e a desregulação das vias metabólicas gerais e dos seus substratos naturais. O resultado final deste processo, acompanhado das restantes formas de actuação dos PAs, é, frequentemente, a necrose das células afectadas (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999).

- **Stress oxidativo.** Para além da formação de aductos, o mecanismo de alquilação dos derivados pirrólicos potencia a oxidação de moléculas de capacidade redutora. Verificou-se que os PAs levam à depleção do glutatião nas células endoteliais hepáticas e que a administração de N-acetil-cisteína, um precursor do glutatião, diminui os efeitos oxidativos dos PAs nestas células (DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; Wang, Kanel e DeLeve, 2000). Adicionalmente, o fornecimento contínuo de glutatião às mesmas tem o importante efeito de impedir a morte celular e prevenir o desenvolvimento da hepatopatia (DeLeve, Shulman e McDonald, 2002). Seja pela acção de mecanismos de protecção, ou por força da presença destes derivados instáveis, os PAs operam então uma generalização do estado de oxidação celular e assim promovem a degradação das suas estruturas e disrupção das suas funções, nas quais se inclui, por exemplo, o dano mitocondrial, facilitador dos processos apoptóticos. Outra importante consequência deste efeito é a acumulação progressiva de metabolitos tóxicos e moléculas danificadas nas paredes das células do endotélio sinusoidal, o que, acompanhada de posteriores efeitos como o desenvolvimento de fibrose nestas células, contribui significativamente para a obstrução das vénulas hepáticas (Chojkier, 2003; DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; Neuman *et al.*, 2015).

- **Indução da resposta inflamatória e desregulação da comunicação intercelular.** A presença dos PAs no organismo e os seus efeitos de stress oxidativo vão proporcionar a libertação de citocinas e outras moléculas inflamatórias pelos monócitos, macrófagos e demais células envolvidas na resposta à agressão dos PAs. Exemplos são o TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alfa - Factor de Necrose Tumoral Alfa), directamente indutor da morte celular, e a IL-1 β (Interleucina I Beta), ambos de propriedades pro-coagulantes, acção essa que exerce uma importante influência no desenvolvimento da hepato- e pneumotoxicidade por PAs; assim como a IL-6 e IL-8 e a fibrina, fibrinogénio e factor VIII, que se vão depositar nas paredes das veias e sinusoides hepáticos (Chen e Huo, 2010; Chojkier, 2003; DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; Neuman *et al.*, 2015). Por outro lado, verifica-se a diminuição dos níveis de proteínas anticoagulantes (DeLeve, Shulman e McDonald, 2002). Importante ainda é referir a indução da produção e libertação de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor – Factor de Crescimento Endotelial Vascular) pelos hepatócitos, em resposta ao dano das células endoteliais, consequente diminuição do fluxo sanguíneo e hipóxia do tecido hepático adjacente. Por sua vez, o VEGF induz o aumento da replicação endotelial, a qual agravará a obstrução das vénulas hepáticas e aumentará a probabilidade de proliferação de mutações induzidas pelos PAs (Chojkier, 2003; EMA European Medicines Agency, 2014; Yang *et al.*, 2016). No sentido contrário, o dano provocado às células sinusoidais impede também a

produção e libertação de factores de crescimento reguladoras da homeostase e do ciclo de vida dos hepatócitos, promovendo a sua desregulação e tornando-os mais susceptíveis à agressão dos PAs a vários níveis (Chojkier, 2003).

- **Acção anti-mitótica.** Os PAs provocam uma pronunciada inibição da proliferação celular, nomeadamente nos hepatócitos. Este persistente efeito anti-mitótico dá-se principalmente por acção dos álcoois pirrólicos (dehidronecinas) e deve-se, possivelmente, à interferência com o citoesqueleto de tubulina (Wiedenfeld *et al.*, 2008), evitando ou interrompendo o ciclo de divisão celular e dos processos homeostáticos e metabólicos associados e originando o aparecimento de megalócitos (hepatócitos de volume aumentado, contendo um núcleo grande e hipercromado) e corpos necróticos (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016). Outra das razões apontadas para a ocorrência da megalocitose é a mutação e disfunção de genes reguladores do ciclo celular, o que, inibindo a mitose, leva a uma contínua síntese de DNA e proteínas (Prakash *et al.*, 1999). Quer os megalócitos constituam causa ou consequência do efeito anti-mitótico dos PAs, a ocorrência de ambos tem um papel central no desenvolvimento da toxicidade dos mesmos. Embora esta acção tenha como consequência imediata a inibição da proliferação celular, e assim constitua uma protecção inicial contra o desenvolvimento cancerígeno e mutagénico, a mesma vai ser importante para a efectivação dos outros mecanismos moleculares e fisiopatológicos da toxicidade dos PAs. Para além disso, esta mesma acção anti-cancerígena é facilmente neutralizada e ultrapassada nos casos de exposição regular e intermitente aos PAs, em que os contactos renovados com as toxinas se dão após um período de tempo suficiente para que a inibição mitótica deixe de se fazer sentir; assim facilitando o desenvolvimento da acção carcinogénica dos PAs (Harris e Chen, 1970; IPCS, 1988; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Para que possa ocorrer, no entanto, esta acção dos PAs deve ser acompanhada precisamente de um estímulo à divisão celular (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2016), estímulo esse que pode ser proporcionado pelo efeito necrótico agudo da agressão dos PAs ao tecido hepático ou por qualquer outro factor que promova a regeneração celular, incluindo aqueles que naturalmente existem já em indivíduos jovens em crescimento (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; EMA European Medicines Agency, 2014; Prakash *et al.*, 1999). Porém, apesar da sua importância como marcador do desenvolvimento da toxicidade dos PAs, os megalócitos não foram ainda observados em preparações histológicas provenientes de casos de intoxicação humana por estas substâncias (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Prakash *et al.*, 1999).

- **Indução da apoptose.** A promoção da indução da apoptose pelos PAs pode ser efetuada por diferentes vias, umas mais diretas, outras derivadas dos efeitos interligados descritos anteriormente. Encontram-se sob estudo os vários modos pelos quais esta se pode concretizar por efeito dos PAs. Duas vias, porém, pelas quais esta se pode efectivar são através do aumento dos níveis de Bax (uma proteína pro-apoptótica) e através da activação da via apoptótica intrínseca, mediada pela mitocôndria, com a libertação do citocromo c, activação da caspase-3 e degradação da proteína Bcl-x (anti-apoptótica) (Chojkier, 2003; Neuman *et al.*, 2015).

É importante notar que todos estes processos se encontram interligados e são frequentemente interdependentes, para que possam ocorrer a um nível significativo. O desenvolvimento geral da hepatopatia por PAs inicia-se através do dano provocado à vasculatura e às células do parênquima hepático. A disrupção geral do sistema metabólico e homeostático da célula, associada à acumulação dos produtos do stress oxidativo e à incapacidade da mesma em regenerar ou absorver esses produtos vai promover a sua acumulação nas células endoteliais hepáticas e nas paredes dos sinusoides. Já a acção anti-mitótica dos PAs vai impedir a regeneração celular normal, contribuindo para a desregulação geral dos processos celulares e facilitando as condições de morte celular; e provocar o aumento de volume das células sinusoidais, agravando a obstrução não-trombótica ao fluxo sanguíneo. Por sua vez, a libertação de factores pró-inflamatórios e a desregulação da comunicação intercelular vai promover a vulnerabilização dos hepatócitos, estimular a proliferação rápida das células endoteliais, o que leva à privação de oxigénio no tecido hepático, e efectivar outros efeitos a nível da coagulação e promoção da apoptose. Esta última pode ainda ser activada, levando à morte de grandes porções de tecido hepático. As consequências destes processos vão desde a hipertensão portal e insuficiência hepática à fibrose, cirrose e necrose, falência hepática e morte (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; Chen e Huo, 2010; Chojkier, 2003; DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2016).

Podem ser identificados três níveis distintos de intoxicação por PAs, extensíveis a todos os órgãos e tipos de manifestações, mas mais facilmente identificáveis pelos seus efeitos a nível hepático: agudo, sub-agudo e crónico. Estas categorias relacionam-se com a quantidade de PAs inerente a cada episódio de exposição, bem como à duração ou frequência dessa exposição, exprimindo a resposta orgânica à conjuntura de cada momento. Podem representar, cada uma por si só, o quadro completo de desenvolvimento da doença ou, por outro lado, apresentarem-se como fases de uma evolução e progressão sequencial entre si (EMA

European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; Neuman *et al.*, 2015; Wiedenfeld *et al.*, 2008).
Caracterizam-se da seguinte forma:

Quadro Clínico Agudo – Os primeiros sinais e sintomas incluem uma dor difusa na região superior direita do abdómen, níveis elevados de bilirrubina sérica, um aumento rápido e significativo de peso e ascite de início súbito, derivada da hipertensão portal, a qual resulta em distensão abdominal, pés edemaciados e oligúria (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; EMA European Medicines Agency, 2014). É comum registar-se icterícia e níveis elevados das enzimas hepáticas (Bunchorntavakul e Reddy, 2013). Verifica-se obstrução e dano das pequenas ramificações das vénulas eferentes, esteatose hepática e hepatomegalia. Em estados agravados é possível que se dê o vômito de sangue, ascite pronunciada e necrose hemorrágica centrilobular em grande extensão (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; IPCS, 1988; Koleva *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999). A morte por falência hepática acontece geralmente dentro de sete dias (IPCS *et al.*, 1989). No entanto, até determinado ponto e extensão da doença, estes efeitos podem ser reversíveis. A fase aguda da toxicidade dos PAs é fatal em cerca de 20 a 40% dos doentes. Cerca de 50% recupera totalmente. Em cerca de 15 a 30% o desenvolvimento da patologia segue o curso de uma fase sub-aguda ou crónica (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; EMA European Medicines Agency, 2014; Neuman *et al.*, 2015). O procedimento clínico habitual para casos de hepatotoxicidade por agentes fitoquímicos é a retirada da toxina em questão quando esta provém de uma toma voluntária, após a qual a função hepática poderá melhorar e retomar o seu estado normal. No entanto, em casos fulminantes, esta prática poderá resultar num declínio abrupto dos níveis de enzimas hepáticas e esta poderá refletir um agravamento da função hepática, em vez da esperada melhoria da sua capacidade funcional (EMA European Medicines Agency, 2014; Neuman *et al.*, 2015). A partir do momento que se verifica uma estabilização da falência hepática, a única solução efectiva poderá mesmo ser o transplante de fígado (Bunchorntavakul e Reddy, 2013). Desta forma, é vital a identificação precoce da toxicidade e do seu agente causador e origem, como formas de permitir uma avaliação da gravidade clínica, a monitorização da função hepática e suficiente margem de aplicação terapêutica.

Quadro Clínico Sub-Agudo – É a forma da intoxicação por PAs mais característica dos mesmos, manifestando-se principalmente sob a condição designada tradicionalmente de VOD (Veno-Occlusive Disease – Doença Veno-Oclusiva), mais recentemente denominada HSOS (Hepatic Sinusoidal Obstruction Syndrome – Síndrome Hepática de Obstrução Sinusoidal) (Chojkier, 2003; DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015;

Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999). Apesar da HSOS não ter a intoxicação por PAs como etiologia exclusiva, podendo resultar da acção alquilante de outros compostos tóxicos e sendo uma complicação frequente do transplante de medula óssea (DeLeve, Shulman e McDonald, 2002), os PAs são os únicos compostos naturais conhecidos capazes de provocar esta síndrome e o seu desenvolvimento total; a qual se pode ainda fazer acompanhar das restantes manifestações orgânicas provocadas pelos mesmos (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015). Deste modo, é possível confirmar mais facilmente a responsabilidade dos PAs no desenvolvimento da HSOS quando simultaneamente se verifica a presença de tumores, cirrose hepática ou hipertensão pulmonar e outros sinais de pneumotoxicidade, ou se circunscreve a presença destes sinais e sintomas em pequenos núcleos regionais ou em indivíduos mais jovens (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015). A HSOS apresenta, apesar de tudo, um quadro fisiopatológico bem definido, sendo assim considerada uma manifestação específica e patognomónica para os PAs (Allgaier e Franz, 2015; Chen, Mei e Fu, 2010; Chojkier, 2003; Moreira *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 1999). Ela pode advir da evolução de uma forma inicialmente aguda ou ser o resultado de uma exposição a níveis de PAs insuficiente para provocar uma resposta imediata mas passível de causar sintomas a médio prazo (IPCS *et al.*, 1989; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Inicia-se pela acção dos metabolitos pirrolizidínicos no tecido hepático, causando dano sinusoidal primário e disfunção do parênquima, os quais resultam em distensão vascular, proliferação do endotélio e das células do ducto biliar, fibrose sinusoidal, hipertrofia medial do fígado, hipertensão portal e congestão hepática por oclusão do lúmen das vénulas centrilobulares. Dá-se assim a perda da irrigação sanguínea, eventualmente levando a necrose hemorrágica do tecido hepático e morte. Níveis elevados das enzimas hepáticas podem ser determinados algumas semanas após a exposição e coincidem com o pico do desenvolvimento da doença, devendo-se provavelmente à necrose isquémica (DeLeve, Shulman e McDonald, 2002). Caracteriza-se clinicamente por dor abdominal intensa, vómitos, diarreia com sangue, hiperbilirrubinémia, ascite e hepatomegalia (Chen e Huo, 2010; Chojkier, 2003; DeLeve, Shulman e McDonald, 2002; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999).

Quadro Clínico Crónico – Em casos em que os níveis de exposição são reduzidos mas significativos e prolongados, contínua ou intermitentemente, ou em que há uma extensão das manifestações sub-agudas no tempo, é possível verificar um quadro crónico de intoxicação, de consequências irreversíveis. Neste contexto, é possível observar o desenvolvimento de megalócitos, uma extensão da área do fígado afectada ou agravamento do estado clínico anterior, com diminuição da função hepática, e, em estágios finais, carcinoma hepatocelular ou

fibrose centrilobular, cirrose e necrose, com falência hepática e morte (Chen e Huo, 2010; Chojkier, 2003; EMA European Medicines Agency, 2014; Fu *et al.*, 2004; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999). As dehidronecinas têm sido apontadas como as principais responsáveis pelas manifestações crônicas das intoxicações por PAs (Edgar *et al.*, 2011; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008), dado que a administração de álcoois pirrólicos em animais, mesmo em elevadas concentrações, não provocam efeitos hepatotóxicos agudos, ao contrário dos ésteres pirrólicos, mas relacionam-se com os efeitos tardios em diferentes órgãos (IPCS, 1988). A este respeito, tem sido colocada a hipótese de que um só episódio de exposição a PAs possa constituir um reservatório de ligação aos tecidos, tal que os efeitos crônicos da exposição aos PAs apenas sejam notados vários meses após o episódio de contacto com a toxina, o que dificulta enormemente a identificação da etiologia e reduz ao mínimo a probabilidade de sucesso terapêutico (Edgar *et al.*, 2011). Considerando o desenvolvimento sub-agudo e crónico no total, a mortalidade estimada para a HSOS, segundo vários autores, varia entre 20 a 50%, estando quase sempre mais próxima do segundo valor (Chen e Huo, 2010; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; EMA European Medicines Agency, 2014; Prakash *et al.*, 1999).

De referir também que a existência prévia de doença hepática, decorrente de infecções virais ou derivada do abuso de substâncias, pode ainda aumentar grandemente a susceptibilidade natural do fígado aos PAs, assim como a indução metabólica causada por terapêuticas concomitantes ou pela utilização de outros produtos fitoterápicos (Chojkier, 2003; Li *et al.*, 2012; Neuman *et al.*, 2015). Quanto à idade, tanto para os ratos como para os bovinos ou os humanos, indivíduos mais jovens revelam-se mais sensíveis e por isso também mais vulneráveis à intoxicação por PAs e, particularmente, à manifestação e desenvolvimento da sua hepatotoxicidade (Chen, Mei e Fu, 2010; Chojkier, 2003; IPCS, 1988; Moreira *et al.*, 2018).

Outros Tipos de Toxicidade:

Apesar do fígado ser o órgão mais frequentemente afectado, aquele no qual se constata os primeiros efeitos de uma intoxicação aguda por PAs e onde mais facilmente se pode notar e acompanhar a progressão da doença, devido à elevada concentração dos metabolitos pirrólicos neste órgão, muitos outros tipos de manifestações de toxicidade provocadas pelos PAs têm sido descritos em animais ou humanos. Para além das manifestações já abordadas, é possível verificar também a indução de pneumotoxicidade, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e neurotoxicidade, entre outras formas mais residuais. Não existe, no entanto, evidência significativa de que os PAs sejam metabolizados e bioactivados fora do fígado em quantidade

suficiente para provocar estes efeitos, pelo que os mesmos são atribuídos à acção dos derivados pirrólicos (os ésteres e, principalmente, os álcoois – as dehidronecinas) formados no tecido hepático e distribuídos através da corrente sanguínea para os órgãos correspondentes (Edgar *et al.*, 2011; Gordon, Coleman e Grisham, 2000; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999). Este processo de distribuição dos agentes tóxicos é designado de efeito de *spillover* ou extravasamento, a partir do fígado, e pode ser importante para prever e monitorizar os efeitos de uma intoxicação por PAs nos diversos órgãos, de acordo com padrões anteriormente observados (IPCS, 1988). Assim, as intoxicações agudas tendem a apresentar-se mais proeminentemente sob a forma de hepatotoxicidade, devido à elevada concentração de metabolitos no fígado num curto espaço de tempo, enquanto que as intoxicações sub-agudas e crónicas permitem um perfil de manifestações mais diverso (IPCS, 1988; Koleva *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld *et al.*, 2008). É, pois, possível que a maior capacidade do fígado na reparação de danos dos seus tecidos e na sua regeneração mantenha minimizadas as consequências da toxicidade dos PAs neste órgão, quando a exposição consiste em pequenas doses e é realizada ao longo de um período de tempo alargado. Nestas circunstâncias, a acumulação gradual de metabolitos pirrolizidínicos pode constituir um reservatório orgânico capaz de, progressivamente, desenvolver manifestações como a hipertensão pulmonar e hipertrofia cardíaca e de promover processos cancerígenos, ao mesmo tempo que o fígado se mantém virtualmente inalterado (Edgar *et al.*, 2011).

As manifestações pneumotóxicas e cardiotóxicas provocadas pelos PAs estão frequentemente interligadas na sua ocorrência, posto que o essencial das segundas decorre do desenvolvimento das primeiras (EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988). Os derivados pirrólicos formados no fígado, em especial as dehidronecinas bifuncionais, e distribuídos através da corrente sanguínea chegam assim à circulação pulmonar, onde vão promover a sua acção sobre as arteríolas pulmonares, causando um tipo de dano nas células endoteliais semelhante àquele causado nas vénulas hepáticas em contexto de HSOS. Da mesma forma, a conjugação dos diversos efeitos descritos para a hepatotoxicidade é determinante na sua acção a nível pulmonar, provavelmente com ênfase aumentado para os processos de stress oxidativo (Chojkier, 2003). Isto leva assim à alteração morfológica das arteríolas, com hipertrofia do músculo liso vascular e espessamento do endotélio, proliferação endotelial, um desenvolvimento do processo inflamatório agudo e acumulação intravascular de linfócitos, monócitos e estruturas disfuncionais, assim iniciando a obstrução vascular. Como consequência, diminui a irrigação sanguínea dos pulmões e dá-se o desenvolvimento da hipertensão pulmonar, levando à formação de edema alveolar intersticial, podendo mesmo

progredir até à necrose medial das artérias pulmonares (Chojkier, 2003; Edgar *et al.*, 2011; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Prakash *et al.*, 1999). A hipertensão e o processo inflamatório, bem como a própria reacção aos danos celulares causados pelos PAs, vão promover a coagulação sanguínea, que irá facilitar a formação de trombos e sua acumulação nas pequenas artéria pulmonares, causando a oclusão das mesmas, o que, por sua vez, agrava o processo e faz aumentar o esforço cardíaco, em particular do ventrículo direito, para bombear o sangue a ser reoxigenado no tecido pulmonar, constituindo-se assim um caso clássico de *cor pulmonale*. A continuação deste processo pode, deste modo, levar ao desenvolvimento de hipertrofia ventricular direita, edema generalizado, hepato- e esplenomegalia, cianose, insuficiência cardíaca congestiva e, em última instância, mesmo à morte (COT Committee on toxicity, 2008; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Para além de tudo isto, algumas experiências em animais identificaram a ocorrência de miocardite e edema focal do miocárdio (IPCS, 1988), enquanto outras alterações extravasculares do tecido pulmonar podem ocorrer, entre as quais o espessamento do septo alveolar e edema pulmonar, capazes de provocar inúmeras dificuldades respiratórias e de agravar o quadro provocado pela *cor pulmonale* (Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; Moreira *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 1999). Apesar de relativamente pouco proeminente, a atenção à hipertensão pulmonar e reconhecimento das suas causas são de particular importância devido à facilidade que esta condição tem em passar despercebida ou em ser associada à toxicidade dos PAs e assim dificultar a identificação de uma potencial exposição prolongada a baixos níveis dos mesmos, de forma contínua ou intermitente, apenas sendo reconhecidas já na presença de situações crónicas irreversíveis. Lesões pulmonares e cardíacas crónicas podem ser causadas pela maioria dos PAs capazes de provocar lesões hepáticas crónicas, embora nem todos os PAs hepatotóxicos sejam também pneumotóxicos e cardiotoxicos e sejam requeridas doses totais mais elevadas para se poder observar um efeito a nível pulmonar. De entre eles, a fulvina e a monocrotalina são especialmente activas (Chojkier, 2003; Edgar *et al.*, 2011; Edgar, Molyneux e Colegate, 2015; IPCS, 1988).

No que diz respeito às manifestações de nefrotoxicidade provocadas pela exposição aos PAs, relativamente menos frequentes que as anteriores, têm sido observados, em testes laboratoriais e através de análises a animais mortos por intoxicação, diversas características fisiopatológicas: danos necróticos no glomérulo renal; espessamento das artérias interlobulares; alterações degenerativas nas células endoteliais e mesangiais; trombose capilar; megalocitose tubular e necrose das células epiteliais tubulares com oclusão do lúmen; fibrose intersticial e periglomerular; etc (IPCS, 1988).

Finalmente, quanto à neurotoxicidade dos PAs, o estudo de alguns casos de intoxicação animal pelos mesmos permite também verificar a ocorrência de lesões degenerativas no SNC (Sistema Nervoso Central), em particular no encéfalo (IPCS *et al.*, 1989). A este respeito, os alcalóides do género *Trichodesma* (pertencente às Boragináceas), têm sido especialmente estudados, nomeadamente a tricodesmina (EMA European Medicines Agency, 2014). Esta pode causar paresia dos membros, lesões necróticas no SNC, encefalite (provocando sintomas como vertigens e cefaleias que podem progredir até ao delírio e perda de consciência), assim como convulsões, depressão respiratória e mesmo morte (EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989; Moreira *et al.*, 2018).

Avaliação do Risco

O conhecimento da exposição efectiva dos humanos a certos compostos e a avaliação do risco que tal constitui é uma questão complexa e multifactorial. Em primeiro lugar, é necessário reconhecer as potenciais fontes e vias de exposição, identificando depois as que constituem um risco efectivo, agudo ou crónico, e as que acabam por ver a sua influência diluída por condicionantes circunstanciais. De forma complementar, é também necessário que sejam determinados os diferentes valores de exposição para os quais se obtêm diferentes respostas qualitativas no humano, caracterizar essas respostas e por fim estabelecer, de forma tão rigorosa quanto possível, os limites máximos aceitáveis de exposição a estas entidades para a saúde humana. O caso dos PAs é bem exemplificativo da natureza combinada e multifactorial deste tipo de estudo.

As duas mais expressivas vias de exposição dos humanos aos efeitos tóxicos dos PAs, considerando o número de casos conhecidos, são a contaminação de colheitas de cereais, nomeadamente de trigo e painça, e o uso de preparações terapêuticas e de suplementação alimentar à base de plantas que contêm estes alcalóides. Os géneros *Senecio*, *Symphytum*, *Crotalaria* e *Heliotropium* são os mais frequentemente relacionados com episódios de intoxicação em seres humanos (Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989; Neuman *et al.*, 2015).

Genericamente, os indivíduos do sexo masculino apresentam-se como mais vulneráveis à toxicidade dos PAs do que os do sexo feminino, constituindo-se como um grupo de risco

devido à maior capacidade de actividade metabólica que as suas enzimas microssomais hepáticas apresentam e consequente extensão aumentada da bioactivação (Fu *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2018; Wiedefeld *et al.*, 2008). Quanto à idade, a maioria dos autores defende que a susceptibilidade é maior em indivíduos mais jovens, crianças e fetos, existindo no entanto alguns resultados contraditórios a este respeito e que poderão indicar uma relativa protecção a estes compostos nos primeiros anos de vida, pelo menos nos animais usados experimentalmente (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; Chen, Mei e Fu, 2010; Edgar *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2004; IPCS, 1988; Moreira *et al.*, 2018; Wiedefeld *et al.*, 2008). Outras condições concomitantes podem ainda exacerbar os efeitos tóxicos dos PAs, como sejam factores nutricionais, a presença prévia de doença hepática, o uso de substâncias capazes de provocar, terapia medicamentosa indutora do metabolismo hepático (ex.: barbitúricos), infecções bacterianas e virais ou mesmo a presença elevada de metais no organismo, como o cobre (Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; Li *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2018; Wiedefeld, 2011; Wiedefeld *et al.*, 2008). Uma das razões apontadas para a aparente maior vulnerabilidade de fetos (após determinado período de gestação), recém-nascidos e crianças, além da maior actividade das enzimas hepáticas, é precisamente o facto de estes apresentarem níveis naturalmente elevados de cobre no tecido hepático (Edgar *et al.*, 2011). Por outro lado, a exposição aos PAs e sua metabolização hepática tem o potencial de induzir variações na expressão de algumas enzimas metabolizadoras e suas isoformas, podendo aumentar ou inibir a sua própria metabolização e a de outros substratos importantes na resposta à agressão dos PAs e assim influir no desenvolvimento da sua toxicidade. Estes processos ocorrem diferentemente, de acordo com as variações enzimáticas inter-espécies, os tecidos nos quais os PAs exercem as suas acções e as próprias condições fisiológicas em que se encontram, sendo, também por isso, difícil fazer uma previsão do curso da sua toxicidade (Chojkier, 2003; Fu *et al.*, 2004).

Vias de Exposição:

Vias Directas:

Contaminação de Colheitas:

A forma historicamente mais comum de intoxicação humana em grande escala é feita através da contaminação de colheitas de alimentos ou matérias-primas essenciais à dieta humana e

incidindo sobre uma dada comunidade. Estas resultam normalmente de uma mistura das plantas desejadas com material vegetal proveniente de espécies produtoras de PAs, frequentemente as suas sementes, que pelo seu tamanho diminuto podem escapar ao processo de selecção. Estas misturas podem ocorrer devido à coexistência das várias espécies no terreno da colheita, após a ocorrência de cheias nos campos de cultivo, ou dar-se aquando da homogeneização dos lotes e seu transporte. Geralmente estas contaminações são eficientemente controladas através da prática das modernas técnicas de colheita e de triagem das sementes, existindo, no entanto, um risco significativo nas regiões e comunidades que não dispõem destes meios, nomeadamente em países em vias de desenvolvimento (Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999). De resto, nem sempre a triagem dos cereais garante que os mesmos não se encontrem contaminados no momento da sua transformação e consumo, pelo que mesmo eliminadas as sementes e outros materiais contaminantes, pequenas partículas e pulverizações de e sobre estes podem subsistir na mistura final, a qual poderá assim apresentar níveis significativos de PAs (Edgar, 2003; EMA European Medicines Agency, 2014). Neste contexto são exemplificativos os relatos de surtos epidémicos de contaminação por PAs em plantações de trigo ou após a moagem dos cereais ocorridos na União Soviética (Culvenor, 1983; EMA European Medicines Agency, 2014; Prakash *et al.*, 1999), Índia (Culvenor, 1983; EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988), Afeganistão (Culvenor, 1983; Kakar *et al.*, 2010; Mohabbat *et al.*, 1976) ou Tajiquistão (EMA European Medicines Agency, 2014; Moreira *et al.*, 2018). Proeminentes na acção tóxica destes casos e particularmente bem adaptados às condições climáticas propícias ao crescimento do trigo estão algumas espécies do género *Heliotropium*, em especial a *Heliotropium lasiocarpium*, *H. europaeum*, *H. eichwaldi* e a *H. popovii* (IPCS, 1988; Kakar *et al.*, 2010; Mohabbat *et al.*, 1976; Moreira *et al.*, 2018; Prakash *et al.*, 1999). É ainda importante notar a influência que a globalização dos mercados alimentares tem tido na tendência de disseminação pelo mundo de espécies de plantas produtoras de PAs que anteriormente se encontravam geograficamente delimitadas, obrigando ao reforço de medidas de segurança alimentar onde estas não eram previamente necessárias (EMA European Medicines Agency, 2014).

Apesar de técnicas analíticas de elevada precisão, como a cromatografia líquida e a cromatografia gasosa associadas à espectroscopia de massa, serem habitualmente usadas para a detecção e quantificação em laboratório de quantidades mínimas de PAs, não existem ainda disponíveis testes rápidos para *screening* destas substâncias, passíveis de serem usados a nível

industrial e comercial para a sinalização e quantificação dos PAs em misturas complexas (EFSA, 2011; Neuman *et al.*, 2015; Wiedenfeld, 2011).

Preparações Terapêuticas e Suplementos Alimentares à Base de Plantas Produtoras de PAs:

A utilização de preparações vegetais com objetivo terapêutico ou dietético tem sido realizada sob diversos âmbitos e condições de acessibilidade. Tendo em conta a sua participação, combinada ou singular, como tratamento, profilático, tónico ou suplemento alimentar, a emergência destas formas pretende dar resposta a um variado leque de necessidades. Muitas vezes, o seu uso advém de uma prática tradicional, perpetuada por uma herança cultural mais ou menos geograficamente circunscrita, enquanto noutras reflete a falta de acesso aos sistemas e cuidados de saúde ou mesmo a rejeição dos valores e práticas nos quais estes se fundamentam. Desde há mais de vinte anos que as designadas terapias alternativas e complementares têm conhecido um significativo aumento nos países industrializados. Estas práticas encontram-se já tão disseminadas que constituem mesmo um comportamento quase universal (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; Neuman *et al.*, 2015; Röder, 2000; Roeder, 1995; Wiedenfeld e Edgar, 2011). Adicionalmente, a forma mais simples de apresentação destes produtos e a qual se usa na preparação de formas mais elaboradas para aplicações específicas é frequentemente a de misturas herbais complexas, constituídas por várias espécies vegetais, de origens diversas e conteúdo químico desconhecido ou não adequadamente controlado. É também comum que estas formas herbais sejam indicadas, aconselhadas e vendidas precisamente como misturas de diferentes ervas, tentativa de estabelecer uma sinergia entre as suas diferentes acções, o que, por outro lado, pode aumentar o seu potencial de toxicidade e dificultar grandemente a análise e o desenvolvimento de métodos de *screening* para estas substâncias (Bunchorntavakul e Reddy, 2013; Li *et al.*, 2013; Neuman *et al.*, 2015).

No que diz respeito à incorporação de plantas produtoras de PAs na formulação destas preparações tradicionais, o fenómeno é praticamente endémico em países como a China, Índia e do continente africano (Neuman *et al.*, 2015; Röder, 2000). No entanto, a intoxicação por PAs encontra-se relacionada tanto com preparações artesanais para consumo próprio, como com formas comercialmente disponíveis, frequentemente também nos denominados países desenvolvidos (IPCS, 1988). Embora de menor frequência em países ocidentais, também nestes têm sido comuns as intoxicações por PAs devido ao consumo de infusões feitas a partir de

plantas que os contêm; e apesar de identificados muitos dos produtos comercialmente disponíveis contendo PAs potencialmente perigosos, muitas vezes estes permanecem no mercado. Um exemplo é o caso da *Symphytum officinalis*, a Consolda-Maior, sobejamente reconhecida pelo seu conteúdo em PAs (são conhecidos pelo menos dez, entre os quais alguns carcinogénicos em animais (Li *et al.*, 2012)) e, no entanto, amplamente disponível ainda em alguns países na forma herbal, em pomadas ou em cápsulas indicadas para facilitação da digestão (EMA European Medicines Agency, 2014; Fu *et al.*, 2001; IPCS *et al.*, 1989; Neuman *et al.*, 2015; Prakash *et al.*, 1999; Ridker *et al.*, 1985). Mulheres grávidas e lactantes são mais vulneráveis e constituem um grupo de risco para a intoxicação com PAs, precisamente pelo facto de muitas destas misturas vegetais serem comercializadas e publicitadas especialmente para elas (EMA European Medicines Agency, 2014; Neuman *et al.*, 2015). Também óleos de *Borago* e de *Echium*, usados como suplementos alimentares, podem ainda ser encontrados à venda, apresentando um risco considerável, mas difícil de determinar (EFSA, 2011).

Num estudo em que foram obtidas amostras provenientes de seis países europeus, entre as quais suplementos alimentares encontrados em supermercados e outras lojas de venda a retalho, determinou-se que em 60% destes era possível descobrir a presença de PAs, embora as suas concentrações variassem bastante. Enquanto as mais elevadas correspondiam aos suplementos alimentares produzidos a partir de plantas produtoras de PAs, cujos elementos mais proeminentes eram do tipo licopsamina (licopsamina, intermedina e equimidina); também aqueles em cuja constituição não entraram plantas produtoras de PAs apresentaram níveis significativos dos mesmos, provavelmente devido a um processo de contaminação cruzada. É ainda de referir que nas preparações em que se incluíram estratos oleosos de plantas produtoras de PAs não foram encontrados níveis significativos dos mesmos (Mulder *et al.*, 2017).

A frequência do aparecimento de manifestações tóxicas causadas pelo uso de preparações à base de plantas contendo PAs, artesanais ou comercialmente disponíveis, é ainda tida como grandemente subestimada devido à falta de notificação e relato desta prática, posto que apenas uma parte dos utilizadores informa os profissionais de saúde da inclusão destes produtos nas suas terapias (Neuman *et al.*, 2015; Wiedenfeld, 2011). Adicionalmente, a disseminação da prática de uso destas plantas, bem como a manifestação de efeitos crónicos a médio e longo prazo e a dificuldade de um diagnóstico específico precoce contribuem ainda para que a verdadeira dimensão do impacto da toxicidade dos PAs na saúde humana por esta via não seja facilmente determinada (IPCS, 1988).

Usos Alimentares Ocasionais:

De menor expressão em número de casos relatados e com uma etiologia mais difícil de identificar, encontram-se os episódios resultantes da incorporação ocasional de elementos de plantas produtoras de PAs na alimentação de indivíduos ou pequenas comunidades. A utilização de folhas de espécies de *Borago*, *Symphytum* e mesmo *Senecio* em saladas ou o uso destas plantas para a preparação de alguns molhos são exemplos deste tipo de ocorrências (Edgar *et al.*, 2011; EFSA, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfeld, 2011; Wiedenfeld e Edgar, 2011). Porém, e tal como na secção anterior, embora desprovido de intenção terapêutica ou dietética, o comportamento mais importante de assinalar é a preparação de infusões com estas plantas, em especial a partir das espécies de *Symphytum* (Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; Ridker *et al.*, 1985). Outras espécies produtoras de PAs podem ainda ser utilizadas para o fabrico de diversas bebidas em diferentes países (IPCS, 1988).

Não obstante, também em infusões preparadas com outras plantas, não produtoras de PAs e de uso generalizado (chá preto, chá verde, menta, rooibos, camomila, etc. – acedidos em postos de venda a retalho), foram encontradas quantidades elevadas destes compostos. Uma análise feita a vários destes produtos herbais resultou na verificação de que 91% continha um ou mais deste tipo de alcalóides. Das várias amostras tomadas, as ervas de rooibos foram as que apresentaram uma concentração média de PAs mais elevada (7,99 µg/L), enquanto a camomila apresentou a menor (3,67 µg/L). A concentração máxima foi determinada como sendo de 64 µg/L. Já a concentração média para a soma de todos os PAs verificados nas infusões foi de 6,13 µg/L, correspondendo a cerca de 460 µg/Kg de material vegetal. Os PAs mais comuns nestas misturas herbais foram os do tipo senecionina (senecionina, retrorsina, senecifilina, etc.). Uma hipótese explicativa para este fenómeno é a contaminação cruzada destas ervas durante a sua produção e processamento, realizados num contexto de insuficiente controlo da qualidade (Mulder *et al.*, 2017).

Vias Indirectas:

Exposição Sistemática por Via Alimentar:

Por fim há que considerar um tipo de exposição que não implica um contacto directo com material primário contendo as toxinas em consideração ou com qualquer forma onde estas

tenham sido deliberadamente incluídas; e em que, simultaneamente, a mesma se possa dar de forma sistemática, em pequenas, mas significativas concentrações, de forma prolongada, contínua ou intermitente, e atingindo numerosos sectores da população. Esta via é para os PAs a via alimentar, onde é possível que certos alimentos de consumo humano, nas suas fases de produção, processamento e distribuição, sejam contaminados por estes compostos em quantidade insuficiente para provocar qualquer reacção aguda, mas potencialmente perigosa a médio e longo prazo. Muitos alimentos poderão ser relevantes neste enquadramento, mas consideram-se particularmente importantes para o caso dos PAs o papel da carne, leite, mel e ovos.

- **Carne:** Tal como para os humanos, os PAs são tóxicos para um considerável número de animais. De entre aqueles habitualmente parte da cadeia alimentar do ser humano encontram-se os grupos dos suínos e das aves, os mais sensíveis aos PAs; cavalos e bovinos, de susceptibilidade intermédia; e ovelhas e cabras, as quais são mais resistentes devido à protecção conferida pelas enzimas digestivas presentes no rúmen, sendo afectadas apenas após longos períodos de exposição (IPCS *et al.*, 1989; Prakash *et al.*, 1999; Wiedenfled e Edgar, 2011). A intoxicação por PAs é mesmo considerada a forma mais comum de intoxicação de animais produtores de alimentos ou matérias-primas usadas na produção de géneros alimentícios; ou eles próprios destinados a abate para posterior consumo humano (Prakash *et al.*, 1999). Países com casos notificados de intoxicação de gado por PAs incluem a África do Sul, o Zimbabué, Austrália, Brasil, Espanha, Bélgica, França, Reino Unido, Estados Unidos e Canadá. De entre as plantas que, de forma mais comum, têm provocado estes efeitos estão os do género *Senecio* (Neuman *et al.*, 2015). Apesar disto, não é ainda clara a permanência destas moléculas e seus derivados nos tecidos dos animais no momento do consumo da sua carne e a influência que possa ter neles o processamento e a preparação dos alimentos, com potenciais consequências para a saúde humana (Edgar *et al.*, 2011; Wiedenfled *et al.*, 2008; Wiedenfled e Edgar, 2011). Embora a grande maioria dos PAs ingeridos pelos animais experimentais sejam excretados dentro de 24 horas, cerca de 20% são capazes de formar aductos com várias estruturas moleculares, uma fracção dos quais será transformada em dehidronecinas, capazes de provocar efeitos tardios e prolongados ao constituírem-se como um reservatório de PAs nos tecidos (Eastman, Dimenna e Segall, 1982; Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; Mattocks, 1968; Mulder *et al.*, 2017; Prakash *et al.*, 1999). A sua relevância para a saúde daqueles que consomem esta carne não está, porém, ainda bem determinada (Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; Wiedenfled *et al.*, 2008).

- **Leite:** Pela sua proveniência animal, o leite tem sido encarado como uma potencial fonte de contaminação e exposição a PAs, tanto para os animais como para os seres humanos. Estudos em animais têm assim verificado que PAs obtidos através da alimentação ou administrados aos mesmos são transferidos para o leite de indivíduos lactantes, assim contribuindo para a exposição a quem o consoma (Candrian *et al.*, 1984; Eastman, Dimenna e Segall, 1982; IPCS, 1988). No entanto, foi também observado, após centrifugação do conteúdo lipídico, que a maior parte dos PAs é excretada na fracção correspondente ao leite desnatado, o que indica que a transmissão para o leite é principalmente uma via para PAs polares, passíveis de serem eliminados na sua maioria por via renal (Eastman, Dimenna e Segall, 1982). Assim, em condições normais, esta deverá ser a principal via de eliminação, mantendo-se as concentrações de PAs no leite como pouco significativas, desde que a exposição aos mesmos permaneça a nível ambiental. Já em relação aos humanos, apesar de se encontrarem descritas na literatura algumas suspeitas de intoxicações em bebés recém-nascidos pela amamentação, em nenhum caso pôde inequivocamente ser estabelecida a correlação entre esta via e a intoxicação por PAs (Wiedenfeld *et al.*, 2008). Porém, de forma mais transversal a uma dada população ou comunidade, é ainda importante considerar o risco de exposição aos PAs através do consumo de leite de vaca industrialmente recolhido, processado e distribuído. A este respeito, afigura-se improvável que um conjunto de casos de intoxicações agudas em larga escala possa ocorrer como efeito do consumo de leite industrial, dado que este resulta de diversas origens e é produzido sob diferentes condições, passando por múltiplos estágios de processamento e diluição, e cujo controlo da qualidade é amplamente efectuado. No entanto, é crucial não desprezar um potencial risco de exposição a doses sub-agudas de PAs através de um consumo frequente de leite residualmente contaminado, o qual poderá contribuir para um efeito cumulativo de exposição a estes compostos, isoladamente durante um longo período ou adicionando-se a outras fontes de PAs (COT Committee on toxicity, 2008; Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; Mulder *et al.*, 2017).

- **Mel:** O mel é frequentemente uma fonte significativa de obtenção de PAs por via alimentar. Estes encontram-se em grande quantidade no néctar e no pólen, na sua maioria na forma de N-óxidos polares, pelo que também a sua solubilização e contaminação natural do pólen para o néctar da planta ou para o mel, por acção das abelhas ou do apicultor, ocorre facilmente e em extensão suficiente para que o mel, como produto final, possa constituir uma importante e frequentemente negligenciada fonte destes alcalóides (Allgaier e Franz, 2015; Boppré, Colegate e Edgar, 2005; Edgar *et al.*, 2011). Diversas plantas produtoras de PAs encontram-se extensamente distribuídas e amplamente acessíveis à acção das abelhas, como a *Senecio*

jacobaea (em cujo mel a concentração máxima de PAs já encontrada foi de 3900 µg/Kg), *Echium vulgare* (até 2800 µg/Kg), *Echium plantagineum* (até 2300 µg/Kg), *Heliotropium amplexicaule* (até 1650 µg/Kg) ou a *Senecio vernalis* (até 1000 µg/Kg). É de salientar especialmente a importância e expressão que estes valores têm nas espécies de *Echium*, entre as quais a *Echium vulgare* e a *Echium plantagineum*, amplamente existentes e acessíveis para a produção de mel em geografias variadas, incluindo na Península Ibérica (Boppré, Colegate e Edgar, 2005; Edgar *et al.*, 2011; IPCS, 1988; Moreira *et al.*, 2018). Mesmo mel alegadamente produzido sem recurso a plantas produtoras de PAs foi determinado como contendo quantidades significativas e até elevadas dos mesmos, assim como algumas amostras sem informação de origem, recolhidas através de venda a retalho; o que poderá indiciar a contaminação do mel livre de PAs pelo pólen de plantas que os contêm, provavelmente através de um processo de difusão (Allgaier e Franz, 2015; Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Estes valores encontram-se muito acima de qualquer norma ou recomendação geral das autoridades regulamentares para a exposição a PAs por via alimentar, ao que acresce o facto de normalmente não ser realizada qualquer monitorização para estes compostos no mel de venda a retalho. Esta conjuntura aumenta consideravelmente o risco potencial que o mel pode apresentar no respeitante à exposição aos PAs, em particular nos casos mais susceptíveis dos fetos e crianças (Edgar, Roeder e Molyneux, 2002; EFSA, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014). Apesar disto, para adultos e em casos em que se dá uma dieta equilibrada e variada, o consumo de mel não é habitualmente suficiente para que a dose total ingerida possa provocar o aparecimento de manifestações tóxicas, sendo no entanto importante não desprezar os efeitos sub-agudos ou crónicos que um consumo prolongado pode provocar (Campos e Proença da Cunha, 2001; EFSA, 2011; IPCS, 1988). De notar que a exposição aos PAs pode mesmo atingir o dobro para as pessoas que consomem regularmente mel produzido localmente, sem diluição com outros de diferentes proveniências, em relação àquelas que habitualmente consomem mel vendido a retalho e de distribuição alargada. Amplas variações têm sido encontradas, no que diz respeito às concentrações de PAs no mel, tendo em conta as suas diferentes origens (EFSA, 2011).

- **Ovos:** Apesar de relativamente menos estudado, algumas fontes apontam ainda para o potencial papel que o consumo de ovos possa ter na exposição a PAs, bem como, a montante, para a sua contaminação a partir do alimento consumido pelas aves, tendo já sido encontrados em alguns ovos alcalóides característicos da *Heliotropium europaeum* e da *Echium plantagineum* em quantidades de 5 a 168 µg/Kg ou até 9,7 µg por ovo (Allgaier e Franz, 2015; Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; Wiedenfeld *et al.*, 2008). Embora estes valores

tenham resultado de intoxicações notórias dos animais, outros poderão ocorrer em quantidades que não permitam uma identificação imediata do surto e assim contribuir para a exposição cumulativa dos humanos aos PAs, através da sua alimentação.

Estimativas e Determinações Quantitativas:

Em Humanos:

A determinação das doses estimadas de PAs para os casos onde a sua exposição a humanos é reportada, suspeitada ou conhecida é quase sempre extremamente difícil de fazer, em especial nos casos decorrentes de surtos epidémicos causados por contaminação de colheitas. Nestas condições é quase impossível assegurar que as análises às amostras disponíveis sejam representativas de toda a extensão da contaminação, assim como nenhuma determinação exacta da quantidade de material contaminado consumido e da duração desse consumo podem ser feitas com elevado nível de certeza e representatividade, para isto contribuindo ainda inúmeros outros factores de heterogeneidade. Muitos casos relatados na literatura não possuem estes registos e nos que os possuem estes foram obtidos por meio de amostragens aleatórias ou não-sistemáticas e através de um elevado número de pressupostos (IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989). Ainda assim, os casos de intoxicação humana são o material mais directamente relevante para uma efectiva avaliação do risco dos PAs para a saúde humana, quer pela possibilidade de verificar por que vias e de que modo se dá a exposição, quer devido ao estudo da relação dose-resposta que estes especificamente permitem.

Atentando nos casos relatados de surtos epidémicos de contaminação por PAs em colheitas de cereais é possível verificar, no caso indiano, que a mesma se deu principalmente através de sementes de *Crotalaria nana* e foi estimada uma dose diária de PAs de 0,66 mg/kg de massa corporal para a população exposta (Culvenor, 1983; IPCS, 1988). Já no caso afegão, foram registadas cerca de 8000 incidências e centenas de mortes durante o biénio de 1974-75 e calcula-se que a dose diária de PAs tenha sido de 0,033 mg/Kg e que o consumo individual tenha totalizado cerca de 1,46 g de PAs na forma de heliotrina, durante os dois anos (IPCS, 1988; Kakar *et al.*, 2010; Mohabbat *et al.*, 1976).

Vale a pena notar que em ambos estes casos paradigmáticos as doses individuais diárias e/ou totais estimadas são inferiores a algumas provocadas pelo uso de preparações herbais medicinais ou de suplementos alimentares contendo plantas produtoras de PAs; o que reforça a necessidade de conhecer e controlar estes comportamentos (IPCS, 1988). De facto, algumas

das mais elevadas doses diárias estimadas de PAs já registadas e que tiveram como consequência hepatopatas agudas e morte, resultaram precisamente da utilização destas preparações herbais. Como exemplos estão o caso do consumo de *Heliotropium eichwaldi* num tratamento para a epilepsia, resultante em doses de cerca de 3,3 mg/Kg diárias ou a utilização de extractos de *Senecio longilobus* em crianças, com doses diárias de PAs variando entre 0,8 a 1,7 mg/Kg e um registo máximo de 3 mg/Kg, resultando em consequências agudas evidentes e necrose hepática extensiva (Culvenor, 1983; IPCS, 1988). Seja pela tradição do seu uso em algumas comunidades pelo efeito cicatrizante que apresenta, em saladas na alimentação ou ainda devido à extensa oferta comercial de que, apesar de tudo, continua a gozar, têm sido também relativamente frequentes as intoxicações por *Symphytum officinalis*, a Consolda-Maior (Edgar *et al.*, 2011; EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; Ridker *et al.*, 1985). O seu uso em preparações várias na forma de alimentos, suplementos alimentares, infusões, pomadas ou outras encontra-se assim bastante disseminado, embora seja difícil determinar exactamente a sua completa extensão (Fu *et al.*, 2001; IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989; Prakash *et al.*, 1999). É estimado que a dose de diária de PAs provocada pelo consumo de folhas de consolda possa chegar aos 0,1mg/Kg, enquanto que o uso de preparações comercialmente disponíveis, à base das folhas ou raízes desta planta, foi calculado como podendo provocar doses de 0,015 mg/Kg diários, a qual é estimada ser a menor dose já registada capaz de provocar HSOS em humanos (EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; IPCS *et al.*, 1989). Num outro caso de intoxicação por uso de suplementação alimentar contendo partes ou extractos da consolda, foi considerada uma dose de 0,014 mg/Kg/dia como sendo a dose diária mínima capaz de provocar manifestações agudas ou sub-agudas de HSOS, ainda que consumida gradualmente durante um período de 120 dias, totalizando 1,7 mg/Kg de PAs (Ridker *et al.*, 1985). Noutro caso ainda, de intoxicação de uma mulher grávida por via alimentar, foi estimado que uma dose diária de 20 a 30 µg de PAs, durante o período que durou a gravidez, tenha sido a responsável pela HSOS, falência hepática e morte do feto sem que, no entanto, a mãe tenha sido afetada (Rasenack *et al.*, 2003), o que beneficia a tese que atribui maior susceptibilidade aos fetos e indivíduos de menor idade.

Em Estudos Experimentais Animais:

Os trabalhos laboratoriais de determinação quantitativa da toxicidade têm, na sua maioria, feito uso de ratos como meios de observação. A avaliação do risco dos PAs para a saúde humana é fundamentada em estudos experimentais animais e, por isso, têm sido apresentadas

e discutidas diferentes abordagens e metodologias para a transformação das doses obtidas experimentalmente em valores com significado para a determinação do risco em humanos. Alguns documentos de aspiração normativa têm sido redigidos com o objectivo de compensar e harmonizar as diferenças inter-espécies determinantes da toxicidade. Ainda assim, a comparação directa entre resultados animais (nomeadamente a partir de ratos) e humanos pode constituir uma base sólida de evidência científica para a avaliação toxicológica. No entanto, permanece ainda a questão em aberto de se as diferenças entre espécies devem ou não excluir o uso de alguns animais para a obtenção de informação quantitativa a ser usada na avaliação do risco toxicológico em seres humanos (EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988). Apesar disto, a partir destes estudos têm sido determinados os valores de LD50 (Lethal Dose for 50% - Dose Letal Média) para alguns PAs, após administrações i.p. (intraperitoneais), na maioria das vezes, em ratos machos, das quais resultaram manifestações de necrose hemorrágica hepática e morte (COT Committee on toxicity, 2008; IPCS, 1988).

A informação disponível, derivada de dados experimentais, sugere fortemente que uma só dose ou episódio de toxicidade provocados por PAs, provavelmente assim como uma exposição prolongada a baixas doses, podem levar ao desenvolvimento de cirrose e necrose hepáticas, a médio ou longo prazo (COT Committee on toxicity, 2008; EMA European Medicines Agency, 2014; Harris e Chen, 1970; IPCS, 1988). Num estudo de carácter teratogénico foi administrada uma dose de heliotrina a 50 mg/Kg de massa corporal a ratos fêmea durante a sua segunda semana de gestação, a qual teve o efeito de induzir variadas malformações e disrupções no normal desenvolvimento fetal. Quando a dose foi aumentada para 200 mg/Kg, o resultado foi a imediata morte intrauterina (EMA European Medicines Agency, 2014; IPCS, 1988; Roeder, 1995). Nos estudos de aferência quantitativa da carcinogenicidade, uma só administração i.p. em ratos demonstrou poder vir a desencadear necrose hepatocelular e efeitos oncológicos, assim como repetidas pequenas doses de PAs (Culvenor, 1983; Harris e Chen, 1970). É então importante notar que as doses que têm sido registadas como eficientes na indução de tumores em ratos em condições experimentais se situam na sua maioria entre 2 a 6 mg/Kg de massa corporal/dia, no período experimental inicial, e entre 0,2 a 3 mg/Kg/dia no prolongamento dos estudos. Ora, estes valores são sensivelmente da mesma magnitude que os das doses diárias estimadas para diversos episódios de toxicidade de PAs em seres humanos, os quais se situam entre 0,01 e 10 mg/Kg de massa corporal/dia (Culvenor, 1983; EMA European Medicines Agency, 2014). Já as menores doses únicas registadas como capazes de provocar a morte em ratos por administração i.p., embora variem com o alcalóide usado, situam-se geralmente entre uma dezena e algumas centenas de

miligramas por quilograma de massa corporal: valores que superam largamente os já referidos, estimados para os casos de exposição em humanos (Culvenor, 1983; Wiedefeld *et al.*, 2008). Adicionalmente, esquemas de administrações intermitentes têm demonstrado resultar em maiores taxas de indução de tumores, quando comparados com sistemas de dosagem contínua, o que provavelmente se dá devido à cessação da inibição mitótica inicial provocada pelos PAs e pode significar um risco particularmente aumentado no caso humano, onde a exposição por via alimentar se pode dar de forma intermitente e prolongada (Harris e Chen, 1970; Wiedefeld *et al.*, 2008).

Com os dados disponíveis ao momento da constituição do grupo de trabalho, uma comissão articulada pela OMS (Organização Mundial de Saúde) para a discussão da evidência existente a respeito dos PAs determinou que as doses totais dos mesmos, estimadas para os casos de surtos epidémicos e outros relatos de HSOS em humanos e expressos sob a forma de heliotrina, variam entre 1 e 167 mg/Kg de massa corporal. Estes valores encontram-se maioritariamente compreendidos naqueles estimados para os casos não-fatais (1 a 120 mg/Kg de massa corporal), assim como nos dos resultantes em morte (6 a 167 mg/Kg de massa corporal). Deste modo, comparando estes valores com aqueles estimados para a dose letal total em ratos, calculada a partir dos números de LD50 de diversos PAs e expressa na forma de heliotrina (cerca de 360-3270 mg/Kg de massa corporal), verifica-se que as doses de exposição humana aos PAs são marcadamente inferiores às dos animais experimentais, para a obtenção de efeitos semelhantes (IPCS, 1988). Estes resultados são aceites e reproduzidos por outras instituições de autoridade toxicológica pois, apesar dos valores de LD50 usados para comparar doses de diferentes PAs serem baseados em administrações i.p. e não por via oral, a morte dos sujeitos experimentais foi provocada por necrose hemorrágica hepática, a qual pode funcionar como marcador de hepatopatia, que é a base da avaliação do risco dos PAs (COT Committee on toxicity, 2008; EFSA, 2011); donde se demonstra a importância de uma determinação extensiva e exacta de um quadro de valores de LD50 para os diversos PAs conhecidos. No entanto, no que diz respeito aos valores da exposição humana aos PAs, deve ser notado que todas as estimativas são efectuadas com base em dados e informação limitada, extrapoladas de conjunturas mal conhecidas e construídas sobre múltiplos pressupostos, sendo, portanto, de confiabilidade ainda incerta. Ainda assim, uma análise dos dados disponíveis parece indicar claramente uma sensibilidade aumentada no humano em relação aos ratos usados experimentalmente, no que concerne ao desenvolvimento de efeitos hepáticos agudos e crónicos provocados pela exposição a PAs. Uma comparação das doses estimadas totais em casos humanos com as doses totais fatais observadas em estudos de toxicidade

crónica em ratos indica, pois, que os seres humanos são mais susceptíveis aos PAs e sugere que os mesmos possam sobreviver por tempo suficiente para sofrer os efeitos sub-agudos e crónicos da sua toxicidade, incluindo o desenvolvimento cancerígeno após apenas uma breve exposição ou uma exposição prolongada a baixos níveis destes compostos (COT Committee on toxicity, 2008; Culvenor, 1983; EMA European Medicines Agency, 2014; Harris e Chen, 1970; IPCS, 1988; Wiedefeld *et al.*, 2008).

Determinações Regulamentares de Avaliação Toxicológica:

Até à data, são poucos os documentos de carácter regulatório e/ou normativo que foram produzidos a respeito da determinação quantitativa de um limite máximo de segurança para a exposição humana aos PAs; e aqueles que existem não se encontram harmonizados entre si, quanto à metodologia aplicada, à forma de apresentação dos resultados, ou mesmo no entendimento que fazem de certos conceitos e categorias básicas, seja no campo medicamentoso ou no alimentar (EMA European Medicines Agency, 2014).

Após a recomendação da OMS, em 1988, de que a exposição a PAs tóxicos deveria ser reduzida tanto quanto possível sem, no entanto, avançar com um valor-limite para a mesma (IPCS, 1988), uma autoridade de saúde alemã produziu e editou em 1992 um documento que previa a aplicação gradual de certas deliberações relativas aos PAs. Este determinava a interdição da comercialização de produtos contendo níveis de PAs 1,2-insaturados cuja indicação terapêutica seja capaz de ultrapassar uma dosagem superior a 1 µg/dia para um período de utilização até 6 semanas/ano; ou superior a 0,1 µg/dia para períodos mais prolongados, nos casos de uso interno. Para aplicação cutânea, o limite estabelecido foi de 100 µg/dia para um máximo de 6 semanas/ano ou de 10 µg para períodos superiores, tendo em conta uma massa corporal de 60 Kg. Estas considerações abrangiam produtos de utilização terapêutica, alguns homeopáticos e suplementos alimentares. Indicava ainda que produtos contendo plantas produtoras de PAs não deviam ser prescritos nem usados durante a gravidez ou lactação e obrigava à apresentação desta informação nos seus rótulos (EMA European Medicines Agency, 2014; German Federal Department of Health Bureau, 1992; Moreira *et al.*, 2018; Wiedefeld, 2011). Já na Áustria e Suíça, as correspondentes autoridades decidiram que todos os produtos herbais e seus derivados deveriam apresentar-se totalmente desprovidos de PAs na sua forma final, mesmo se na sua constituição existisse material proveniente de plantas produtoras destas substâncias (EMA European Medicines Agency, 2014; Moreira *et al.*, 2018; Wiedefeld, 2011). Acrescem assim novos problemas de ordem técnica e de

harmonização, dado que, com o avanço tecnológico, têm sido cada vez menores os limiares de detecção quantitativa de compostos químicos em misturas complexas (Neuman *et al.*, 2015). Posteriormente, também a Bélgica proibiu a comercialização de produtos contendo PAs para uso interno (EMA European Medicines Agency, 2014). Em 2001, os Países Baixos instituíram um limite máximo de 1 µg/Kg ou 1µg/L de PAs para qualquer produto medicamentoso ou alimentar (Moreira *et al.*, 2018; Wiedenfled, 2011). Ainda no mesmo ano, a ANZFA (Australia New Zealand Food Authority) determinou para a Nova Zelândia um limite provisório de 1 µg de PAs/Kg de massa corporal/dia, recomendando a diluição como forma de obter dosagens que não superem este valor, o que constitui uma prática não permitida por muitas outras autoridades correspondentes. Este valor-limite é também muito superior aos das outras determinações regulamentares, o que acontece devido ao facto da ANZFA entender como não provada a actividade carcinogénica em humanos e, além disso, considerá-la improvável devido a um mais eficiente sistema de reparação de DNA (Allgaier e Franz, 2015; Koleva *et al.*, 2012; Neuman *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos da América, a FDA (Food and Drug Administration) decretou a proibição de todos os produtos de suplementação alimentar contendo PAs, argumentando com a ausência de informação quantitativa suficiente para o estabelecimento confiável de uma TDI (Tolerable Daily Intake – Dose diária até à qual não se reconhecem riscos significativos para a saúde de quem é exposto) para os PAs (EMA European Medicines Agency, 2014). Em 2007 e 2008, respectivamente, o BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung – instituto alemão para a avaliação de riscos) e o COT (Committee on Toxicity) britânico publicaram documentos onde aconselham a abstenção do consumo de conserva ou de produtos que a contenham ou aos seus derivados (Allgaier e Franz, 2015). Para além disso, o COT propõe um valor de 0,1 µg/Kg de massa corporal/dia para a ridelina, limite até ao qual não é expectável qualquer consequência não-cancerígena. Os valores para os restantes PAs podem ser obtidos através de uma conversão usando os seus números de LD50. Porém, tendo em conta a possível carcinogenicidade de alguns PAs em humanos, a metodologia usada tem de ser diferente, passando a refletir um efeito cumulativo e de consequências a longo prazo, como são as de natureza genotóxica e carcinogénica. A abordagem passa então pelo cálculo da MOE (Margin of Exposure – Margem de Exposição), uma razão entre um valor-referência – representação de uma dose a partir da qual se observam efeitos adversos, extrapolada a partir dos estudos em animais experimentais – e o nível de exposição estimado em humanos para determinado agente químico. Para o primeiro, o COT fez uso do valor de 0,073 mg/Kg/dia, derivado de um estudo de dois anos de avaliação da carcinogenicidade da lasiocarpina, a qual serve aqui de modelo para os restantes PAs. Neste procedimento, é geralmente considerado que uma MOE de 10000 ou superior representa um

nível de segurança aceitável e confortável para o humano, valor ao qual o COT verificou corresponder uma exposição de 0,007 µg/Kg de massa corporal/dia. Assim, sem que este valor constitua uma TDI aplicável, constata-se que doses inferiores são improváveis de constituir qualquer risco genotóxico e/ou carcinogénico. Do mesmo modo, o COT verificou que, de forma a manter uma MOE mínima de 1000, a concentração máxima de PAs no mel deverá ser de 6,4 µg/Kg de mel (Allgaier e Franz, 2015; COT Committee on toxicity, 2008; Koleva *et al.*, 2012). Em 2011 a BfR publica um documento exortando a que a exposição a PAs por via alimentar não exceda os 0,007 µg/Kg/dia determinados anteriormente, recomendando particular atenção para a minimização da exposição em crianças consumidoras de grandes quantidades de mel (Allgaier e Franz, 2015; EMA European Medicines Agency, 2014). Ainda em 2011 a EFSA (European Food Safety Authority), tendo em conta as prováveis acções genotóxicas e carcinogénicas dos PAs, faz saber que considera a informação disponível relativa à intoxicação humana insuficiente para ser usada como base para o estabelecimento de uma TDI, reiterando o uso da abordagem da MOE e fixando o valor de exposição de 0,007 µg/Kg/dia e superiores como níveis de PAs a evitar pela via alimentar (Allgaier e Franz, 2015; EFSA, 2011). Finalmente, em 2011 a EMA (European Medicines Agency) começa a preparar um documento sobre o uso de produtos medicinais herbais contendo PAs, o qual é adoptado no final de 2014. Baseando-se em considerações toxicológicas e em anteriores avaliações e regulamentações, este recomenda também o uso do valor-limite de 0,007 µg/Kg/dia. Este valor é igualmente tido para adultos, mulheres grávidas ou lactantes e crianças, sendo aplicável a produtos de administração oral ou cutânea. Assim, por exemplo, são contemplados os limites de 0,35 µg/dia para um indivíduo de 50 Kg de massa corporal ou de 0,42 µg/dia para um de 60 Kg. No entanto, a EMA preconiza apenas a utilização destes produtos durante o período máximo de 14 dias, mas não explicita o número possível de ciclos de tratamento por ano, apesar de ser provável que alguns sejam indicados para um uso múltiplo, dentro de um período relativamente curto, ou até por períodos superiores a 14 dias de cada vez (Allgaier e Franz, 2015; EMA European Medicines Agency, 2014).

Conclusão

Os PAs são uma classe de compostos de origem natural, frequentemente encontrados em diversas famílias e géneros vegetais com ampla distribuição geográfica. Embora a sua toxicidade tenha sido alvo de diversos tipos de estudos multidisciplinares, ao longo do tempo, nem sempre tem sido bem conseguida a conciliação do conhecimento científico acumulado sobre estes compostos com a realização de uma avaliação do risco informada e de efectiva tradução regulamentar e legal na realidade quotidiana.

A base para uma abordagem científica desta questão tem, pois, necessariamente de começar por um entendimento da actuação química dos PAs e dos seus mecanismos de toxicidade. Assim, após a sua ingestão, a maior parte destas substâncias é directamente excretada por via renal ou convertida em compostos, também eles de fácil eliminação, que com ou sem conjugação, são excretados da mesma forma; restando no organismo, algumas horas após o contacto, apenas uma fracção da dose inicial. Ainda assim, frequentemente, essa fracção é suficiente para exercer efeitos agudos fatais e mesmo manifestações crónicas tardias, de carácter irreversível. Para que possam ser activos, no entanto, os PAs necessitam de sofrer processos metabólicos de bioactivação, nomeadamente reacções de C-oxidação. Deste modo, produzem metabolitos capazes de efectivar uma acção alquilante, permitida pela deslocalização electrónica ao longo da molécula. Verifica-se então que algumas particularidades estruturais dos PAs são essenciais à sua actividade toxicológica ou influenciam positiva e significativamente a sua expressão. São elas a existência de um núcleo pirrolizidínico 1,2-insaturado; a hidroxilação de elementos da estrutura nécica; a esterificação desses grupos por ácidos carboxílicos; e a ramificação das cadeias principais desses mesmos ácidos. Observa-se ainda que esta actividade toxicológica é tanto maior quanto o é o impedimento estereoquímico que os PAs impõem à acção das esterases e do glutatião, sendo assim superior nos diésteres macrocíclicos e mínima nos PAs monoesterificados. O aprofundamento da toxicidade dos PAs e a extensão dos seus efeitos dependem então de um equilíbrio dinâmico entre os processos de bioactivação e os de destoxificação. O conhecimento rigoroso destes comportamentos pode assim ser importante na exploração de eventuais possibilidades terapêuticas baseadas na minimização da actividade microssomal hepática ou na facilitação da hidrólise e conjugação com o glutatião, num contexto de intoxicação aguda.

O mecanismo geral da toxicidade dos PAs consiste na formação de aductos e *cross-links* entre os seus metabolitos e o DNA, RNA, proteínas, enzimas e outras moléculas estrutural e funcionalmente essenciais à manutenção de diversos níveis de homeostase; promovendo a sua

destruição ou impedimento funcional e levando, a curto, médio ou longo prazo, ao desenvolvimento de diversas manifestações de toxicidade. Assim, genericamente, caso a maioria dos derivados tóxicos dos PAs seja rapidamente hidrolisada ou conjugada com o glutationa, estes são eliminados sem que significativos efeitos tóxicos possam ocorrer. Se, pelo contrário, estabelecem aductos com o DNA, facilitam a ocorrência e fixação de mutações e promovem a progressão de quadros patológicos e a formação de tumores. Se, no entanto, demonstram de forma mais expressiva a ligação a outras macroestruturas celulares, iniciam e incorrem no desenvolvimento de complexos processos fisiopatológicos em diversos tecidos. Exemplos destes efeitos são a incidência aumentada de mutações genéticas e cromossômicas em oncogenes e genes supressores de tumores, a indução de malformações fetais, o aumento do stress oxidativo, a inibição da divisão celular e promoção de vias apoptóticas e a obstrução das vénulas hepáticas e arteríolas pulmonares. Na consideração do potencial dos PAs em concretizar estas acções, porém, é importante não deixar de ter em conta os possíveis factores de diferença interindividual na resposta à intoxicação, como sejam a idade, o sexo, a presença prévia de hepatopatas ou terapêutica concomitante, bem como eventuais especificidades genéticas.

As vias mais comuns da exposição humana aos PAs são a utilização de preparações terapêuticas artesanais e produtos medicinais à base de plantas, suplementos alimentares e o próprio consumo de certos alimentos. Embora de maior prevalência em países onde a prática da medicina tradicional tem maior enraizamento, em todo o mundo a utilização de produtos herbais tem aumentado significativamente, sem que, porém, o necessário controlo da quantidade de PAs que neles se encontra presente tenha acompanhado a tendência. Partes ou extractos derivados da *Symphytum officinale* foram ou, por vezes, são ainda usados como cicatrizantes ou no tratamento de problemas digestivos, assim como a *Borago officinalis* em afecções dérmicas e dos aparelhos respiratório ou gástrico e a *Senecio vulgaris* em problemas de circulação sanguínea. No entanto, uma das questões mais pervasivas e preocupantes é a da preparação de infusões e outras bebidas com plantas produtoras de PAs e com outras contaminadas com os mesmos. Atendendo aos vários relatos de casos de intoxicação atribuídos a estas utilizações e considerando os efeitos fatais ou irreversíveis que uma só exposição por esta via pode causar, o uso de formas herbais contendo PAs ou de outras que com eles possam ter contactado é, pois, fortemente desaconselhado. Uma forma de combater estas práticas e os seus efeitos, ao mesmo tempo que se promove o desenvolvimento da literacia em saúde, é o questionamento aos utentes/doentes acerca da utilização deste tipo de produtos e infusões, acompanhado da prestação de informações e aconselhamento no âmbito

da fitoterapia; com vista a minimizar os seus problemas de saúde e a ir de encontro à suas necessidade.

Quanto à exposição por via alimentar, atendendo à causalidade que aos PAs é atribuída nos episódios de intoxicação aguda e à sua provável genotoxicidade e carcinogenicidade em humanos, a regra é a de que deve ser minimizada tanto quanto possível. A maioria dos autores e instituições de avaliação toxicológica considera que o risco apresentado através de alimentos como a carne, leite, mel, ovos e vegetais, habitualmente usados na dieta humana, não é significativo, no que é relativo à exposição a PAs. É, ainda assim, possível que, em alguns alimentos e regimes dietéticos, as doses genericamente consideradas como seguras sejam já ultrapassadas; sendo desejável mais informação sobre os níveis de PAs em cereais, farinha e nos produtos que os contêm, bem como nos restantes já referidos. No entanto, é provável que seja inevitável a ocorrência de quantidades relativamente pequenas de PAs nestes alimentos, por vezes até de forma intermitente, bem como a sua assimilação por via alimentar. Adicionalmente, as doses estimadas em casos humanos indicam fortemente que os efeitos dos PAs nos mesmos são cumulativos, em face de um consumo prolongado de baixas doses. É, pois, necessário que se estabeleça de forma mais rigorosa, no futuro, o papel que estas concentrações de PAs têm na saúde de quem os consome e a sua influência real no desenvolvimento progressivo de doenças crónicas.

Muito embora as manifestações tóxicas agudas e sub-agudas dos PAs sejam relativamente fáceis de reconhecer e até, possivelmente, patognomónicas, a maioria dos casos crónicos e ainda muitos dos desenvolvimentos sub-agudos permanecem na prática clínica por identificar, ao passo que as suas causas podem mesmo ser confundidas com outras etiologias. Apesar disto, não existem actualmente disponíveis informações relativas a um acompanhamento de longo prazo, após um ou mais episódios de exposição a PAs, com o objectivo de clarificar a acção destes compostos no desenvolvimento de hepatopatias crónicas, processos cancerígenos, *cor pulmonale* ou outras manifestações da sua toxicidade. Acresce também que, apesar dos efeitos qualitativos nos casos agudos serem bem conhecidos, mesmo nestes a relação dose-resposta para os PAs permanece ainda pouco clara e sujeita a inúmeros factores interindividuais. Um facto importante a salientar aqui, derivado da análise comparativa dos valores disponíveis para os humanos e para os animais experimentais, é o paralelismo que é possível estabelecer entre ambos, no respeitante à relação dose-resposta, e até a aparente maior susceptibilidade dos primeiros em relação aos últimos; o que constitui um importante ponto de partida para o empreendimento de qualquer linha de investigação ou deliberação regulamentar.

Considerando as várias determinações de aspiração normativa por parte de entidades nacionais e internacionais a respeito dos PAs, verifica-se que não existe uma deliberação comum para aquilo que deverá ser um valor máximo seguro para o consumo diário destes compostos. Adicionalmente, cada entidade trata a informação disponível ao seu próprio modo, muitas vezes fazendo asserções distintas e aplicando diferentes critérios, pelo que as conclusões nesses casos são necessariamente divergentes. Ainda assim, o valor para o qual o maior número de entidades convergiu ou adoptou é o de 0,007 µg de PAs/Kg de massa corporal/dia, sendo também o menor em termos absolutos, o que melhor reflecte a evidência científica disponível e aquele que é manifestado pelas autoridades europeias. No entanto, restam dúvidas sobre como devem ser realizados os procedimentos de controlo de qualidade nos diversos produtos e quais os limites legais a aplicar sobre o seu conteúdo em PAs. No que respeita às preparações terapêuticas de conteúdo herbal pirrolizidínico, deve ser garantido, logo à partida, que estas apresentam a menor concentração possível de PAs e que esta é tecnicamente inevitável. É então necessário que se proceda a uma estimativa da exposição que advém da sua utilização e garantir que esta não ultrapassa a dose de 0,007 µg/Kg/dia, bem como efectuar uma avaliação geral da relação risco-benefício da incorporação na terapêutica do referido produto. Apenas em casos restritos, de inexistência de alternativa terapêutica ou em cuja especificidade se reconheça a vantagem do seu uso, deverá ser considerado o produto em questão. Fica ainda por esclarecer, porém, a questão do estabelecimento de um período seguro de tratamento.

No âmbito da avaliação do risco dos PAs para os humanos e da exposição aos mesmos, podem então ser consideradas algumas medidas com o objectivo de solucionar problemas e suprir necessidades. Estas passam assim, por exemplo, pela identificação de todas as possíveis vias de exposição aos PAs e da reavaliação da sua importância efectiva e relativa; pela concentração de esforços na colheita rigorosa e extensiva de dados quantitativos referentes a casos humanos e estudos animais; pela harmonização e standardização de conceitos, metodologias de análise, critérios e objectivos na comunidade científica e entre instituições de autoridade regulamentar; e pela formação e sensibilização dos profissionais de saúde para o reconhecimento, nos seus utentes/doentes, de eventuais sinais e sintomas de intoxicação por PAs, associados a comportamentos potencialmente indutores da exposição aos mesmos.

Anexo

A

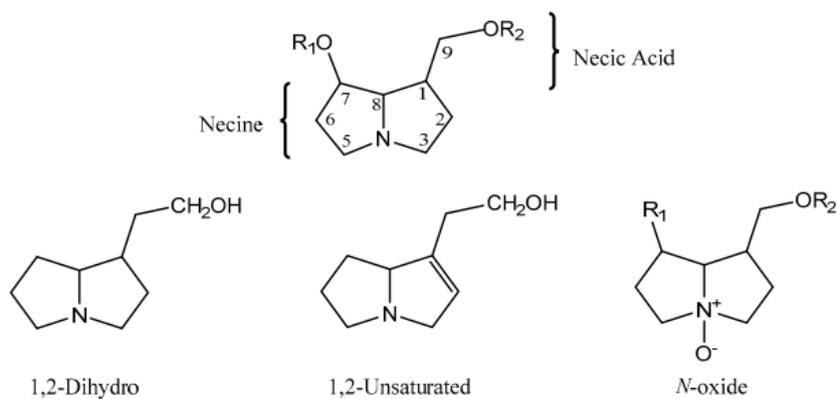


Figura 1 - Estrutura Fundamental dos PAs e Formas de Apresentação das Necinas (Moreira et al., 2018)

B

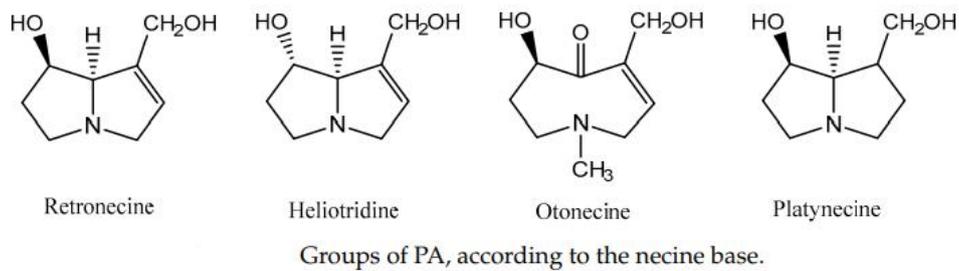


Figura 2 - Grupos-Tipo de PAs, de acordo com a sua Estrutura Nécica (Moreira et al., 2018)

C

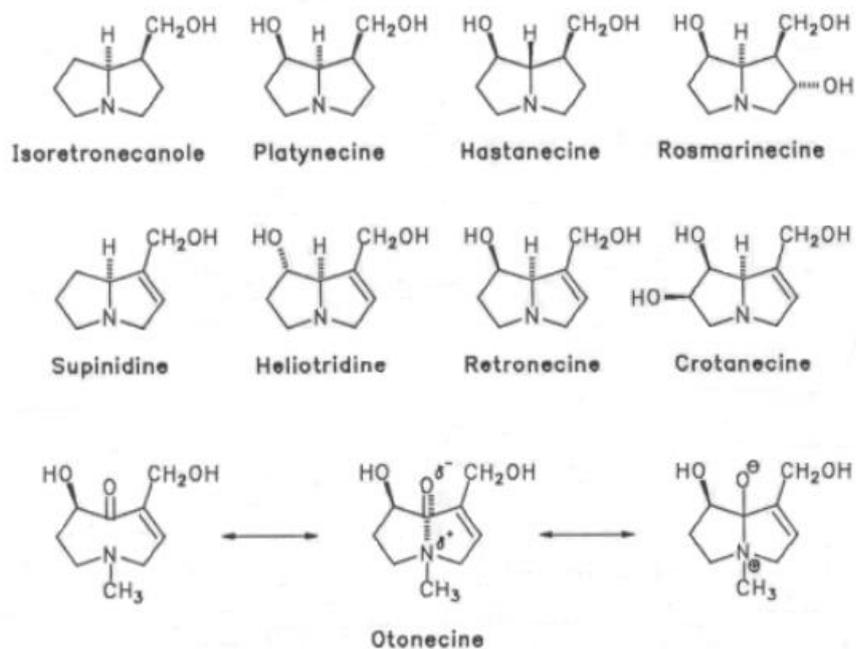


Figura 3 - Exemplos de PAs de Diferentes Grupos-Tipo e com Distintas Substituições e Configurações (Roder, 1995)

D

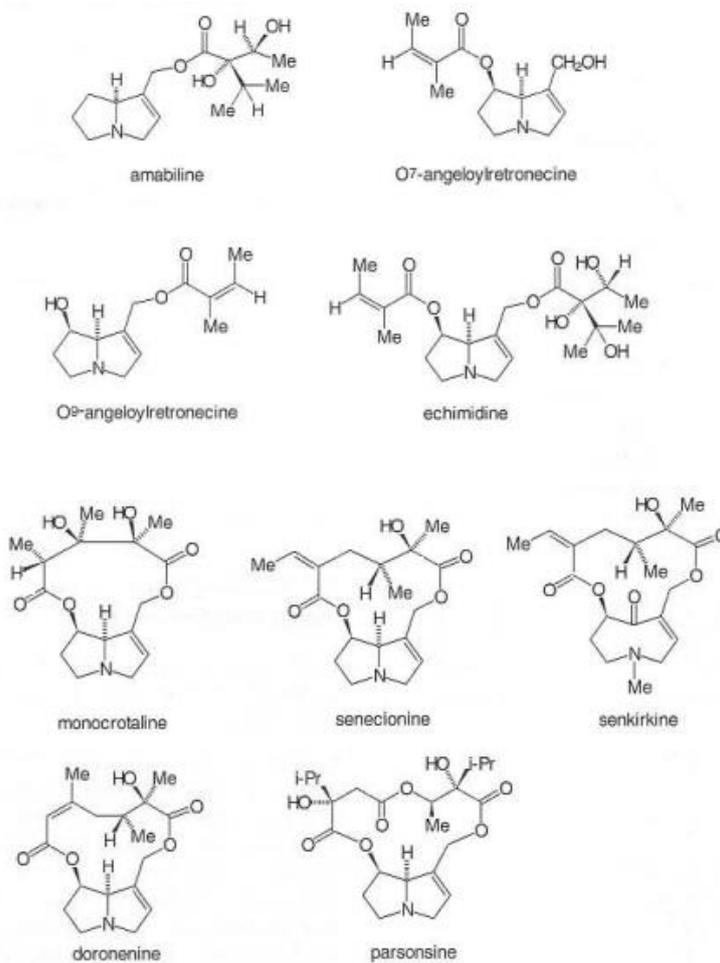


Figura 4 - Exemplos de PAs 1,2-Insaturados com Diferentes Níveis de Esterificação (Roeder, 2000)

E

Biosynthesis of necines

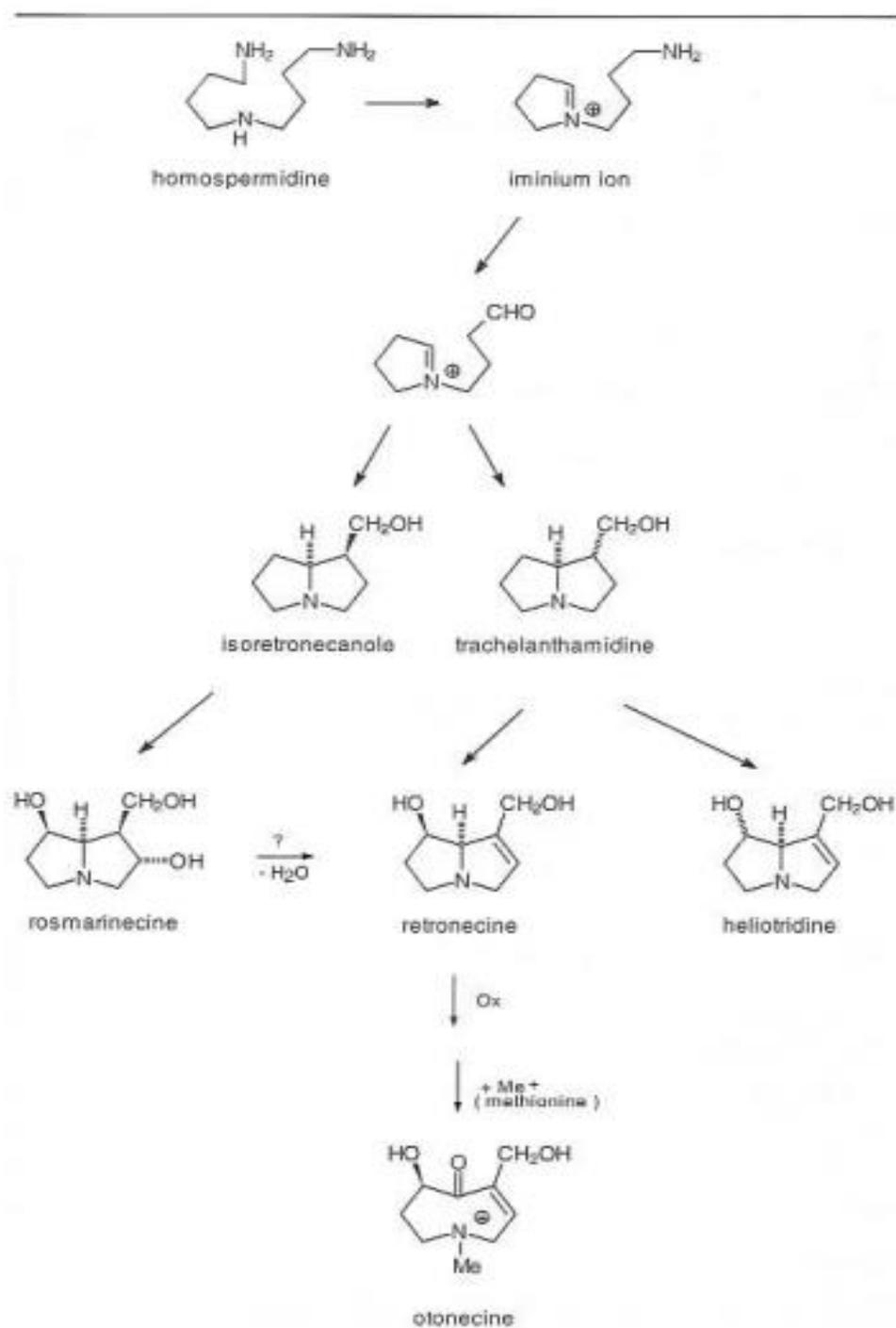


Figura 5 - Biossíntese dos Diferentes Grupos-Tipo de Necinas (Roeder, 2000)

F

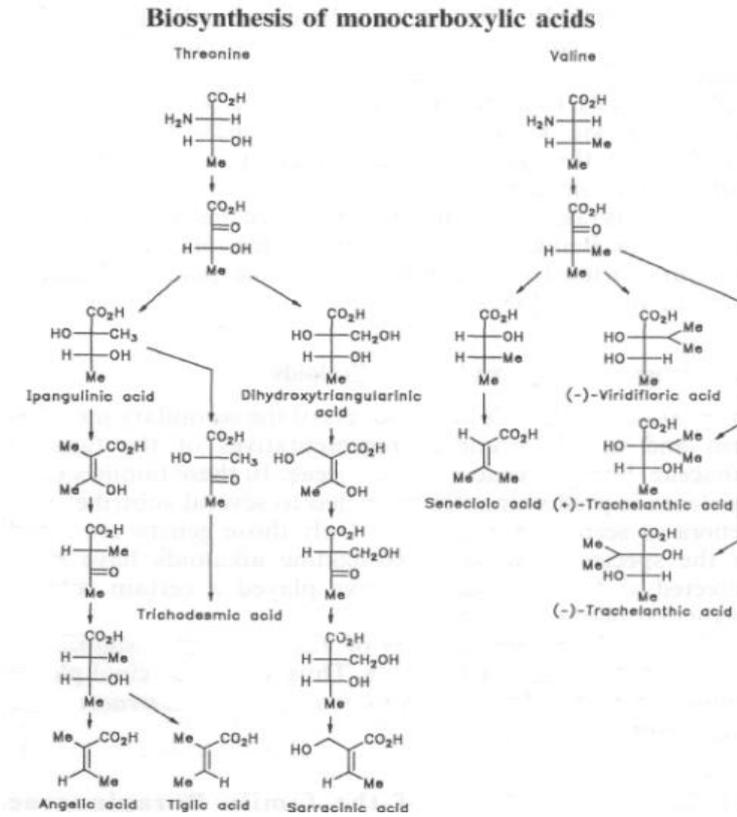


Figura 6 - Biossíntese dos Ácidos Nécicos Monocarboxílicos (Roder, 1995)

G

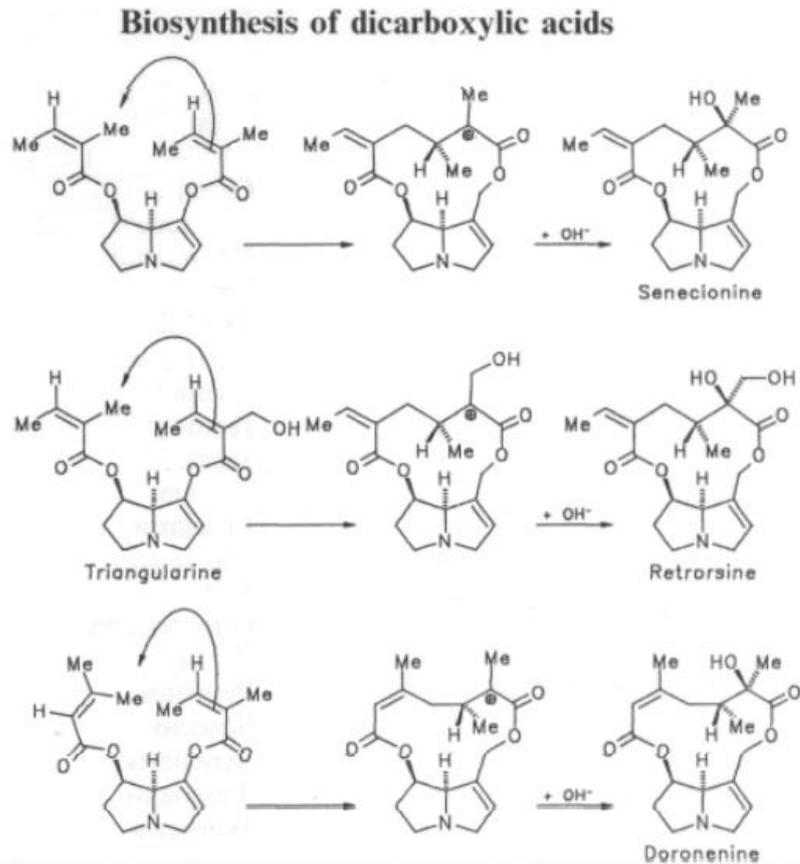


Figura 7 - Biossíntese dos Ácidos Nécicos Dicarboxílicos e Formação de Estruturas Pirrolizidínicas Macrocíclicas (Roder, 1995)

H

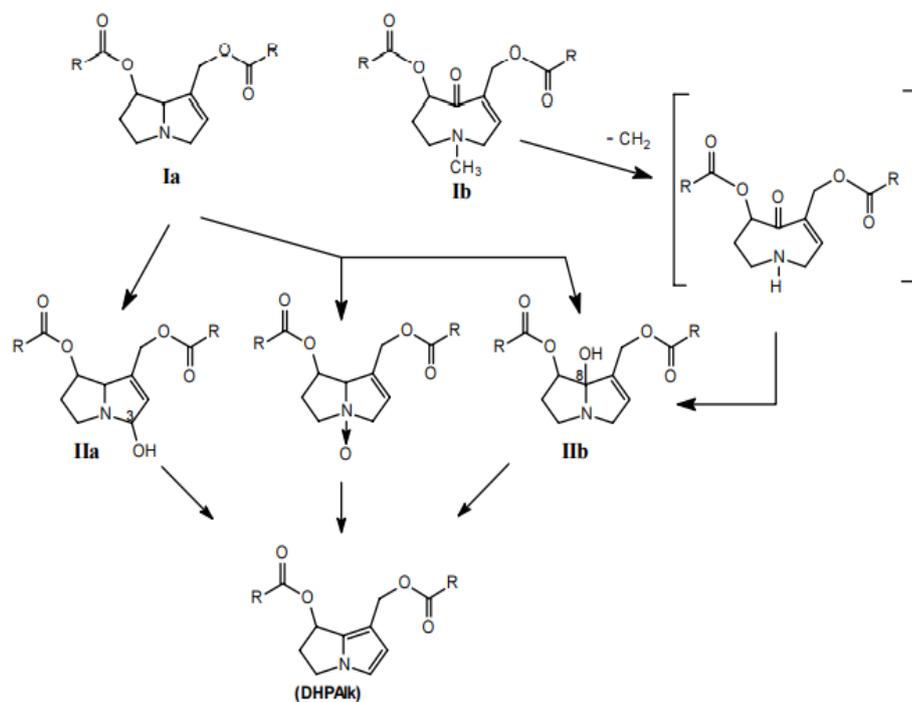


Figura 8 – Bioativação dos PAs por C-Oxidação (IIa) e por N-Desmetilação Oxidativa (IIb). Formação do Éster Didehidropirrolizidínico (DHPAlk) (Wiedenfeld et al., 2008)

I

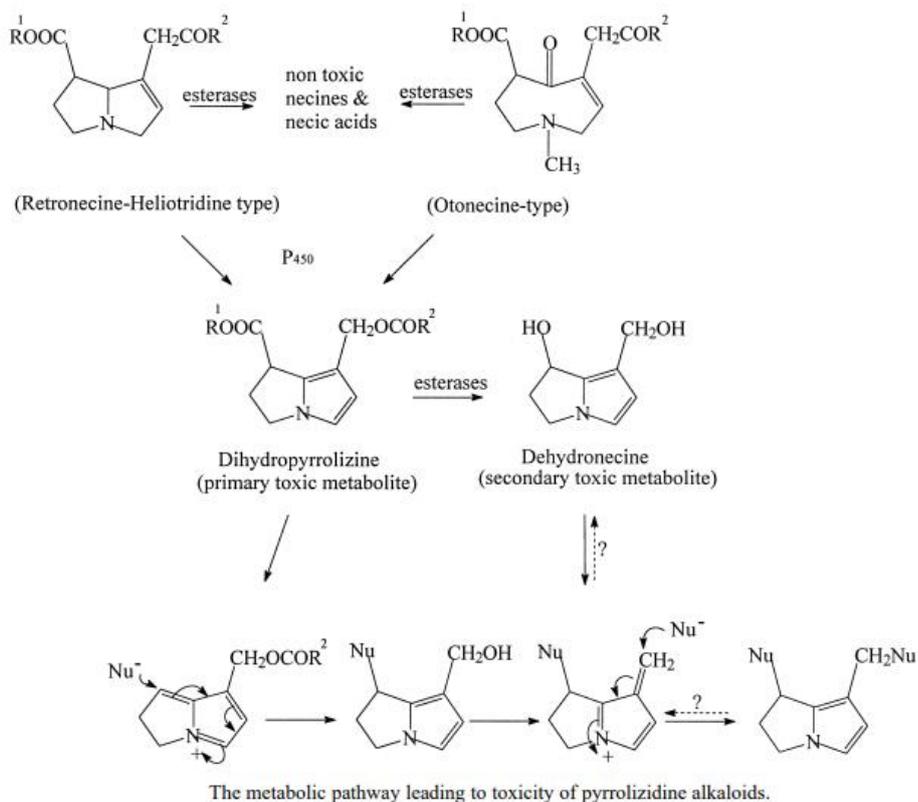


Figura 9 - Formação dos Derivados Tóxicos Primários (Ésteres) e Secundários (Álcoois) e seu Mecanismo de Acção Alquilante (Prakash.et.al., 1999)

J

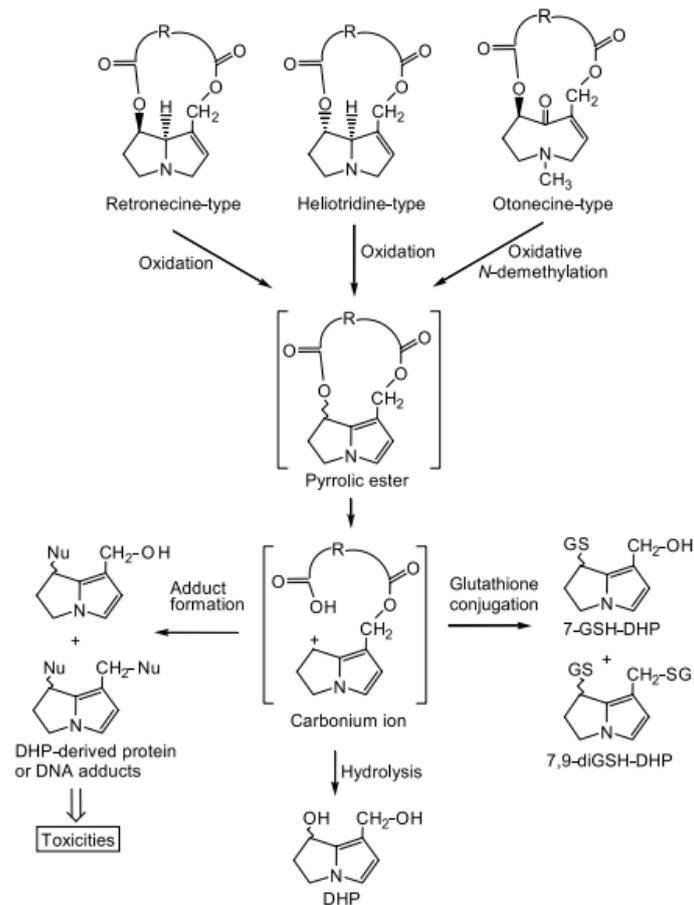


Figura 10 - Esquema-Síntese das Vias de Bioativação e de Metabolização dos Ésteres Pirrólicos (Fu et al., 2004)

K

Alkaloid	LD50 (mg/kg b.w.)
Retrorsine	34
Senecionine	50 – also quoted as 85
Heliosupine	60
Lasiocarpine	72
Seneciphylline	77
Jacobine	77 (mouse)
Riddelliine	105 (mouse)
Symphytine	130 – also quoted as 300
Heleurine	140
Jaconine	168 (female rat)
Monocrotaline	175
Echimidine	200
Spectabiline	220
Senkirkine	220
Heliotrine	300
Echinatine	350
Supinine	450
Europine	>1000
Heliotridine	1200
Intermedine	1500
Lycopsamine	1500

Figura 11 - Valores de LD₅₀ para alguns PAs (COT Committee on Toxicity, 2008)

Apêndice

I

Exemplos de Plantas Produtoras de PAs e suas Utilizações Tradicionais:

Asteraceae:

Duas das espécies mais comuns deste grupo são a *Senecio vulgaris*, conhecida em Portugal como tasneirinha ou cardo morto, e a *Senecio jacobaea* conhecida por tasneira, tasna ou Erva de Santiago (Campos e Proença da Cunha, 2001). Com uma composição química rica em flavonóides, alcalóides e outros compostos, têm sido usadas tradicionalmente como emenagogos e antiespasmódicos, durante o período menstrual, e em problemas de circulação sanguínea, como varizes e hemorróides. Devido à toxicidade dos PAs, no entanto, o seu uso é fortemente desaconselhado (Campos e Proença da Cunha, 2001; Fresno, del, 1999; Roeder, 1995). Estes alcalóides podem também ser encontrados no mel produzido a partir do pólen destas plantas. No entanto, intoxicações por esta via não são comuns, devido à reduzida expressão que o mel apresenta na alimentação humana (Campos e Proença da Cunha, 2001; Fresno, del, 1999). Os PAs podem encontrar-se em toda a planta, mas existem em maior concentração nas sementes (Campos e Proença da Cunha, 2001). Os alcalóides mais comuns na *Senecio vulgaris* são a senecionina, retroscina, ridelina e senecifilina, enquanto na *Senecio jacobaea* os PAs principais são a jacobina, otonecina, senecionina, senquirquina e a jaconina (Campos e Proença da Cunha, 2001; Roeder, 1995).

Outras espécies de Asteráceas, como a *Eupatorium cannabinum*, *Petasites hybridus*, *Petasites officinales* e a *Tussilago farfara* têm sido utilizadas em afecções respiratórias e gastrointestinais, podendo levar a manifestações tóxicas devido ao seu conteúdo rico em PAs (Fresno, del, 1999; Röder, 2000; Roeder, 1995).

No caso da *Tussilago farfara*, podem ser extraídas das folhas e partes aéreas floridas mucilagens contendo ácido urónico, flavonóides, ácidos aromáticos, taninos e outros constituintes, incluindo PAs. A tussilagem tem sido usada tradicionalmente no tratamento da obstrução aguda do aparelho respiratório, inflamações agudas da mucosa orofaríngea, na síndrome gripal, tosse seca, tratamento da gastroenterite e diarreia e, externamente, no tratamento de feridas (Proença da Cunha, 2010; Röder, 2000). Os PAs tóxicos que se apresentam em maior concentração são a senquirquina e a senecionina (Röder, 2000; Roeder, 1995). Devido ao

potencial hepatotóxico dos PAs, o seu uso deve, no entanto, ser evitado e, se compulsório, limitado ao mínimo período possível (Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995).

Porém, existem ainda na família *Asteraceae* alguns PAs cuja actividade toxicológica é reduzida e possivelmente suplantada por potenciais usos terapêuticos. Alguns destes apresentam estruturas cujo núcleo pirrolizidínico se encontra saturado (ou, pelo menos, sem a dupla ligação em C1-C2). Um exemplo desta condição estrutural é a platifilina, que não apresenta actividade hepatotóxica e que tem um historial de uso no tratamento da hipertensão. Outros apresentam um nitrogénio quaternário no núcleo pirrolizidínico. Outros ainda existem na sua forma de N-óxidos. Os derivados quaternários possuem actividade bloqueante neuromuscular e o N-óxido de indicina foi relacionado com uma acção antitumoral (Fresno, del, 1999; Moreira *et al.*, 2018; Proença da Cunha, 2010).

Boraginaceae:

Nas Boragináceas, uma das plantas com maior tradição de utilização medicinal é a *Borago officinalis*, conhecida como Borragem. Tem sido usada internamente e externamente pelas suas propriedades antiinflamatórias, emolientes e diuréticas, sendo as suas folhas e flores ricas em flavonóides, mucilagens, resinas e sais minerais, para além de quantidades menores de PAs (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010). As suas sementes fornecem um óleo rico em ésteres de ácidos gordos insaturados, dos quais se destaca o ácido ómega 6, para além de fitoesteróis e carotenóides. Este óleo é usado internamente através de cápsulas gelatinosas, em situações de hipercolesterolemia, na síndrome pré-menstrual e em transtornos que antecedem o período da menopausa (Proença da Cunha, 2010). Externamente, tem sido usada sob a forma de pomada ou creme, em casos de artrite reumatoide, afecções dérmicas como eczemas ou psoríase e como adjuvante do rejuvenescimento cutâneo (Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995). As partes aéreas são também, por vezes, usadas na alimentação, como temperos ou em saladas (Fresno, del, 1999; Roeder, 1995). Os PAs tóxicos que expressa em maior quantidade são a intermedina e a licopsamina (Roeder, 1995). Devido a estes, o seu uso interno é altamente desaconselhado e o externo deve ser feito de forma muito restrita e atenta (Fresno, del, 1999).

Já as raízes e folhas da *Symphytum officinale*, conhecida como consolda-maior, têm sido tradicionalmente usadas de forma externa, em macerações e unguentos, no tratamento de fracturas ósseas, entorses, distensões e contusões musculares e feridas cutâneas, devido à acção cicatrizante e revitalizadora da ureia – também chamada de alantoína –, a qual possui

proeminente actividade antiinflamatória. Internamente, foi usada em infusões e outras formas líquidas no tratamento de afecções gastrointestinais e do tracto respiratório. Tem sido ainda indicada para a preparação culinária na alimentação vegetariana (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995). Os principais PAs encontrados nos seus extractos são a sinfitina, a licopsamina, a intermedina e a equimidina (Roeder, 1995). Em vista dos inúmeros casos de estudo e de intoxicações acidentais que têm sido reportadas à utilização da consolda, o seu uso interno é completamente desaconselhado e aplicações tópicas devem apenas ser efectuadas sob pele intacta, com preparações de baixas concentrações (Fresno, del, 1999; Proença da Cunha, 2010; Roeder, 1995).

Fabaceae:

Nas Fabáceas, é especialmente conhecido o caso da *Crotalaria retusa*, cujas flores têm sido extensamente usadas em situações de síndrome gripal com tosse ou como antipirético e diurético, dando origem a bastantes casos de intoxicação (Neuman *et al.*, 2015; Proença da Cunha, 2010). A este respeito, há mesmo o registo de surtos de doença hepática, na Índia, nos anos sessenta do século XX, devido à ingestão de cereais contaminados com sementes desta planta, tendo-se verificado muitas mortes que lhe foram atribuídas (Proença da Cunha, 2010). Alguns dos PAs mais comuns do género *Crotalaria* são a monocrotalina, retrorsina e crotanina (Neuman *et al.*, 2015). Casos como os anteriores têm levado à descontinuação gradual do uso medicinal tradicional de algumas plantas desta família (Proença da Cunha, 2010).

2

Propostas de Limites Quantitativos Para a Exposição a PAs 1,2- Insaturados e seus N-Óxidos:

Instituições de Autoridade Regulamentar	Valores-Limite
German Federal Department of Health Bureau (1992)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Uso Interno: <ul style="list-style-type: none"> - 1 µg/dia (máx. 6 semanas/ano) - 0,1 µg/dia (períodos mais prolongados) ○ Uso Externo: <ul style="list-style-type: none"> - 100 µg/dia (máx. 6 semanas/ano) - 10 µg/dia (períodos mais prolongados) <p>(Considerando uma massa corporal de 60 Kg)</p>
Dutch National Institute for Public Health and the Environment (2001)	1 µg/Kg ou 1 µg/L
Australia New Zealand Food Authority (2001)	1 µg/Kg/dia
Committee on Toxicity (2008)	<ul style="list-style-type: none"> ○ PAs considerados não-cancerígenos: 0,1 µg de equivalentes de ridelina/Kg/dia ○ PAs considerados cancerígenos: 0,007 µg/Kg/dia
Federal Institute for Risk Assessment (2011)	0,007 µg/Kg/dia
European Food Safety Authority (2011)	0,007 µg/Kg/dia
European Medicines Agency (2014)	0,007 µg/Kg/dia (máx. 14 dias)

Lista de Referências

- ALLGAIER, Clemens; FRANZ, Stephanie - Risk assessment on the use of herbal medicinal products containing pyrrolizidine alkaloids. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. . ISSN 10960295. 73:2 (2015) 494–500. doi: 10.1016/j.yrtph.2015.09.024.
- BOPPRÉ, Michael; COLEGATE, Steven M.; EDGAR, John A. - Pyrrolizidine alkaloids of *Echium vulgare* honey found in pure pollen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 53:3 (2005) 594–600. doi: 10.1021/jf0484531.
- BUNCHORNTAVAKUL, C.; REDDY, K. R. - Review article: Herbal and dietary supplement hepatotoxicity. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. . ISSN 02692813. 37:1 (2013) 3–17. doi: 10.1111/apt.12109.
- CAMPOS, Maria Da Graça; PROENÇA DA CUNHA, António - **Efeitos Tóxicos no Homem e em Animais Domésticos Provocados por Plantas Espontâneas de Portugal**. Associação ed. Lisboa : [s.n.]. ISBN 9729857946.
- CANDRIAN, U. *et al.* - Mutagenic activity of the pyrrolizidine alkaloids seneciphylline and senkirkine in drosophila and their transfer into rat milk. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 22:3 (1984) 223–225. doi: 10.1016/0278-6915(84)90131-5.
- CHAN, Po C. *et al.* - Toxicity and carcinogenicity of riddelliine in rats and mice. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 144:3 (2003) 295–311. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00240-6.
- CHEN, Tao; MEI, Nan; FU, Peter P. - Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**. . ISSN 0260437X. 30:3 (2010) 183–196. doi: 10.1002/jat.1504.
- CHEN, Zhe; HUO, Ji Rong - Hepatic veno-occlusive disease associated with toxicity of pyrrolizidine alkaloids in herbal preparations. **Netherlands Journal of Medicine**. . ISSN 03002977. 68:6 (2010) 252–260.
- CHOJKIER, Mario - Hepatic sinusoidal-obstruction syndrome: Toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Hepatology**. . ISSN 01688278. 39:3 (2003) 437–446. doi: 10.1016/S0168-8278(03)00231-9.
- CHOU, Ming W. *et al.* - Riddelliine N-oxide is a phytochemical and mammalian metabolite with genotoxic activity that is comparable to the parent pyrrolizidine alkaloid riddelliine. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 145:3 (2003) 239–247. doi: 10.1016/S0378-4274(03)00293-5.

CHOU, Ming W. *et al.* - Correlation of DNA adduct formation and riddelliine-induced liver tumorigenesis in F344 rats and B6C3F1 mice. **Cancer Letters**. . ISSN 03043835. 193:2 (2003) 119–125. doi: 10.1016/S0304-3835(03)00045-4.

CHOU, Ming W. *et al.* - Identification of DNA adducts derived from riddelliine, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 0893228X. 16:9 (2003) 1130–1137. doi: 10.1021/tx030018y.

CHOU, Ming W.; FU, Peter P. - Formation of DHP-derived DNA adducts in vivo from dietary supplements and Chinese herbal plant extracts containing carcinogenic pyrrolizidine alkaloids. **Toxicology and Industrial Health**. . ISSN 07482337. 22:8 (2006) 321–327. doi: 10.1177/0748233706071765.

COT COMMITTEE ON TOXICITY - Statement on Pyrrolizidine Alkaloids in Food. **Committee on toxicity**. 2008).

COULOMBE, Roger A.; DREW, Gail L.; STERMITZ, Frank R. - Pyrrolizidine alkaloids crosslink DNA with actin. **Toxicology and Applied Pharmacology**. . ISSN 0041008X. 154:2 (1999) 198–202. doi: 10.1006/taap.1998.8552.

CULVENOR, C. C. J. - Estimated intakes of pyrrolizidine alkaloids by humans. A comparison with dose rates causing tumors in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**. . ISSN 00984108. 11:4–6 (1983) 625–635. doi: 10.1080/15287398309530372.

DELEVE, Laurie D.; SHULMAN, Howard M.; MCDONALD, George B. - Toxic injury to hepatic sinusoids: Sinusoidal obstruction syndrome (veno-occlusive disease). **Seminars in Liver Disease**. . ISSN 02728087. 22:1 (2002) 27–41. doi: 10.1055/s-2002-23204.

EASTMAN, D. F.; DIMENNA, G. P.; SEGALL, H. L. - Covalent binding of two pyrrolizidine alkaloids, senecionine and seneciphylline, to hepatic macromolecules and their distribution, excretion and transfer into milk of lactating mice. **Drug. Metab. Dispos.** 10 (1982) 236–240.

EDGAR, J. A. - Pyrrolizidine alkaloids and food safety. **Chem. Aust.** 70:2003) 4–7.

EDGAR, J. A. *et al.* - Pyrrolizidine alkaloids in food: A spectrum of potential health consequences. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440049. 28:3 (2011) 308–324. doi: 10.1080/19440049.2010.547520.

EDGAR, John A.; MOLYNEUX, Russell J.; COLEGATE, Steven M. - Pyrrolizidine alkaloids: Potential role in the etiology of cancers, pulmonary hypertension, congenital anomalies, and

liver disease. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 15205010. 28:1 (2015) 4–20. doi: 10.1021/tx500403t.

EDGAR, John A.; ROEDER, Erhard; MOLYNEUX, Russell J. - Honey from plants containing pyrrolizidine alkaloids: A potential threat to health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. . ISSN 00218561. 50:10 (2002) 2719–2730. doi: 10.1021/jf0114482.

EFSA - Scientific opinion on pyrrolizidine alkaloids in food and feed: EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). **The EFSA Journal**. 9:11 (2011) 1–134. doi: 10.2903/j.efsa.

EMA EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs). **EMA/Hmpc/893108/2011**. 44:November (2014) 15.

EVANS, William C. - **Pharmacognosy**. ISBN 9780702029349.

FREI, Hansjörg *et al.* - Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 00092797. 83:1 (1992) 1–22. doi: 10.1016/0009-2797(92)90088-3.

FRESNO, Ángel M. .. Villar DEL - **Farmagnosia General**. 1a. ed. Madrid : [s.n.]. ISBN 8477386404.

FU, P. P. *et al.* - Genotoxic pyrrolizidine alkaloids and pyrrolizidine alkaloid N-oxides - Mechanisms leading to DNA adduct formation and tumorigenicity. **Journal of Environmental Science and Health - Part C Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**. . ISSN 10590501. 19:2 (2001) 353–385. doi: 10.1081/GNC-100107580.

FU, Peter P. *et al.* - Pyrrolizidine Alkaloids - Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. **Drug Metabolism Reviews**. . ISSN 03602532. 36:1 (2004) 1–55. doi: 10.1081/DMR-120028426.

GERMAN FEDERAL DEPARTMENT OF HEALTH BUREAU, GFDHB - Bundesanzeiger. **Dtsch. Apoth. Ztg.** 132:1992) 1406–1408.

GORDON, Gavin J.; COLEMAN, William B.; GRISHAM, Joe W. - Induction of cytochrome P450 enzymes in the livers of rats treated with the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. **Experimental and Molecular Pathology**. . ISSN 00144800. 69:1 (2000) 17–26. doi:

10.1006/exmp.2000.2308.

HARRIS, Paul N.; CHEN, K. K. - Development of Hepatic Tumors in Rats following Ingestion of *Senecio longilobus*. **Cancer Research**. . ISSN 15387445. 30:12 (1970) 2881–2886.

HE, Xiaobo *et al.* - Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts are common toxicological biomarkers of pyrrolizidine alkaloid N-oxides. **Journal of Food and Drug Analysis**. . ISSN 10219498. 25:4 (2017) 984–991. doi: 10.1016/j.jfda.2017.09.001.

HIRONO, Iwao *et al.* - Induction of hepatic tumors in rats by senkirkine and symphytine. **Journal of the National Cancer Institute**. . ISSN 14602105. 63:2 (1979) 469–472. doi: 10.1093/jnci/63.2.469.

HONG, H. L. *et al.* - Chemical-specific alterations in ras, p53, and β -catenin genes in hemangiosarcomas from B6C3F1 mice exposed to o-nitrotoluene or riddelliine for 2 years. **Toxicology and Applied Pharmacology**. . ISSN 0041008X. 191:3 (2003) 227–234. doi: 10.1016/S0041-008X(03)00165-0.

IPCS, International Program On Chemical Safety- - **Environmental Health Criteria 80: Pyrrolizidine Alkaloids**. [S.l.] : World Health Organisation, International Labour Organisation, United Nations Environment Programme, 1988. ISBN 9241542802.

IPCS, International Program On Chemical Safety- *et al.* - Pyrrolizidine alkaloids health and safety guide. 1989) 20.

KAKAR, Faizullah *et al.* - An outbreak of hepatic veno-occlusive disease in Western Afghanistan associated with exposure to wheat flour contaminated with pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Toxicology**. . ISSN 16878191. 2010:February 2008 (2010). doi: 10.1155/2010/313280.

KIM, H. Y. *et al.* - Comparative DNA cross-linking by activated pyrrolizidine alkaloids. **Food and Chemical Toxicology**. . ISSN 02786915. 37:6 (1999) 619–625. doi: 10.1016/S0278-6915(99)00025-3.

KIM, Hea Young; STERMITZ, Frank R.; COULOMBE, Roger A. - Pyrrolizidine alkaloid-induced DNA-protein cross-links. **Carcinogenesis**. . ISSN 01433334. 16:11 (1995) 2691–2697. doi: 10.1093/carcin/16.11.2691.

KOLEVA, Irina I. *et al.* - Alkaloids in the human food chain - natural occurrence and possible adverse effects. **Molecular Nutrition and Food Research**. . ISSN 16134125. 56:1 (2012) 30–52. doi: 10.1002/mnfr.201100165.

LI, Na *et al.* - Hepatotoxicity and Tumorigenicity Induced by Metabolic Activation of Pyrrolizidine Alkaloids in Herbs. **Current Drug Metabolism**. . ISSN 13892002. 12:9 (2012) 823–834. doi: 10.2174/138920011797470119.

LI, Yan Hong *et al.* - Assessment of pyrrolizidine alkaloid-induced toxicity in an in vitro screening model. **Journal of Ethnopharmacology**. . ISSN 03788741. 150:2 (2013) 560–567. doi: 10.1016/j.jep.2013.09.010.

MATTOCKS, A. .. - Toxicity of Pyrrolizidinealkaloids Mattocks. **Nature**. 217:1968) 723.

MATTOCKS, A. R.; CABRAL, J. R. P. - Carcinogenicity of some pyrrolic pyrrolizidine alkaloid metabolites and analogues. **Cancer Letters**. . ISSN 03043835. 17:1 (1982) 61–66. doi: 10.1016/0304-3835(82)90109-4.

MATTOCKS, A. R.; WHITE, I. N. H. - Pyrrolic metabolites from non-toxic pyrrolizidine alkaloids. **Nature New Biology**. . ISSN 00900028. 231:21 (1971) 114–115. doi: 10.1038/newbio231114a0.

MATTOCKS, A. R.; WHITE, I. N. H. - The conversion of pyrrolizidine alkaloids to N-oxides and to dihydropyrrolizine derivatives by rat-liver microsomes in vitro. **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 00092797. 3:5 (1971) 383–396. doi: 10.1016/0009-2797(71)90018-4.

MATTOCKS, A. R.; WHITE, I. N. H. - Toxic effects and pyrrolic metabolites in the liver of young rats given the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 00092797. 6:5 (1973) 297–306. doi: 10.1016/0009-2797(73)90044-6.

MEI, N. *et al.* - Mutagenicity of comfrey (*Symphytum Officinale*) in rat liver. **British Journal of Cancer**. . ISSN 00070920. 92:5 (2005) 873–875. doi: 10.1038/sj.bjc.6602420.

MEI, Nan *et al.* - Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver cll gene of transgenic big blue rats. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 0893228X. 17:6 (2004) 814–818. doi: 10.1021/tx049955b.

MOHABBAT, Omar *et al.* - an Outbreak of Hepatic Veno-Occlusive Disease in North-Western Afghanistan. **The Lancet**. . ISSN 01406736. 308:7980 (1976) 269–271. doi: 10.1016/S0140-6736(76)90726-1.

MOREIRA, Rute *et al.* - Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 19:6 (2018). doi: 10.3390/ijms19061668.

MULDER, Patrick P. J. *et al.* - Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. **EFSA**

Supporting Publications. . ISSN 23978325. 12:8 (2017). doi: 10.2903/sp.efsa.2015.en-859.

NEUMAN, Manuela G. *et al.* - Hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** . ISSN 14821826. 18:4 (2015) 825–843. doi: 10.18433/J3BG7J.

PAVLICA, Dusan; SAMUEL, Irwin - PRIMARY CARCINOMA OF THE LIVER IN ETHIOPIA A STUDY OF 38 CASES PROVED AT POST-MORTEM EXAMINATION *Symyqnpptomatology.* **Br J Cancer.** 24:1 (1969) 22–29.

PETERSON, John E. *et al.* - Neoplasia and Chronic Disease Associated With the Prolonged Administration of Dehydroheliotridine to Rats<xref ref-type="fn" rid="fn2">2</xref>. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute.** 70:2 (1983). doi: 10.1093/jnci/70.2.381.

PRAKASH, Arungundrum S. *et al.* - Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** . ISSN 13835718. 443:1–2 (1999) 53–67. doi: 10.1016/S1383-5742(99)00010-1.

PROENÇA DA CUNHA, A. - **Farmacognosia e Fitoquímica.** 3ª Edição ed. Lisboa : [s.n.]. ISBN 978-972-31-1142-2.

RASENACK, Regina *et al.* - Veno-occlusive disease in a fetus caused by pyrrolizidine alkaloids of food origin. **Fetal Diagnosis and Therapy.** . ISSN 10153837. 18:4 (2003) 223–225. doi: 10.1159/000070799.

RIDKER, Paul M. *et al.* - Hepatic Venocclusive Disease Associated With the Consumption of Pyrrolizidine Containing Dietary Supplements. **Gastroenterology.** . ISSN 00165085. 88:4 (1985) 1050–1054. doi: 10.1016/S0016-5085(85)80027-5.

RÖDER, Erhard - Medicinal plants in China containing pyrrolizidine alkaloids.pdf. **Pharmazie.** 55 (2000) 711–726.

ROEDER, E. - Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie.** . ISSN 00317144. 50:2 (1995) 83–98. doi: 10.1002/chin.199528310.

ROULET, Michel *et al.* - Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. **The Journal of Pediatrics.** . ISSN 00223476. 112:3 (1988) 433–436. doi: 10.1016/S0022-3476(88)80330-5.

RUBIOLO, P. *et al.* - M u t a g e n i c i t y o f pyrrolizidine alkaloids in the Salmonella typhimurium / mammalian m i c r o s o m e s y s t e m. 281:1992) 143–147.

SAMUELSSON, Gunnar - **Drugs of Natural Origin - A Textbook of Pharmacognosy**. 4a. ed. Stockholm : [s.n.]. ISBN 9186274813.

SCHOENTAL, R. - Toxicology and Carcinogenic Action of Pyrrolizidine Alkaloids. **Cancer Research**. . ISSN 15387445. 28:11 (1968) 2237–2246.

WANG, Xiangdong; KANEL, Gary C.; DELEVE, Laurie D. - Support of sinusoidal endothelial cell glutathione prevents hepatic veno-occlusive disease in the rat. **Hepatology**. . ISSN 02709139. 31:2 (2000) 428–434. doi: 10.1002/hep.510310224.

WANG, Yu Ping *et al.* - Human liver microsomal reduction of pyrrolizidine alkaloid N-oxides to form the corresponding carcinogenic parent alkaloid. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 155:3 (2005) 411–420. doi: 10.1016/j.toxlet.2004.11.010.

WANG, Yu Ping *et al.* - Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, monocrotaline, leading to DNA adduct formation in vivo. **Cancer Letters**. . ISSN 03043835. 226:1 (2005) 27–35. doi: 10.1016/j.canlet.2004.11.039.

WANG, Yu Ping; FU, Peter P.; CHOU, Ming W. - Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, retrorsine, leading to DNA adduct formation in vivo. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. . ISSN 16604601. 2:1 (2005) 74–79. doi: 10.3390/ijerph2005010074.

WHITE, I. N. H.; MATTOCKS, A. R.; BUTLER, W. H. - The conversion of the pyrrolizidine alkaloid retrorsine to pyrrolic derivatives in vivo and in vitro and its acute toxicity to various animal species. **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 00092797. 6:4 (1973) 207–218. doi: 10.1016/0009-2797(73)90048-3.

WIEDENFELD, H. - Plants containing pyrrolizidine alkaloids: Toxicity and problems. **Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment**. . ISSN 19440049. 28:3 (2011) 282–292. doi: 10.1080/19440049.2010.541288.

WIEDENFELD, Helmut *et al.* - **Pyrrolizidine Alkaloids - Structure and Toxicity**. [S.l.] : VR Unipress, 2008. ISBN 9783899714265.

WIEDENFELD, Helmut; EDGAR, John - Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. **Phytochemistry Reviews**. . ISSN 15687767. 10:1 (2011) 137–151. doi: 10.1007/s11101-010-9174-0.

XIA, Qingsu *et al.* - Human liver microsomal metabolism and DNA adduct formation of the

tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 0893228X. 16:1 (2003) 66–73. doi: 10.1021/tx025605i.

XIA, Qingsu *et al.* - Metabolic formation of DHP-derived DNA adducts from a representative otonecine type pyrrolizidine alkaloid clivorine and the extract of *Ligularia hodgsonii* hook. **Chemical Research in Toxicology**. . ISSN 0893228X. 17:5 (2004) 702–708. doi: 10.1021/tx030030q.

XIA, Qingsu *et al.* - Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. **Cancer Letters**. . ISSN 03043835. 231:1 (2006) 138–145. doi: 10.1016/j.canlet.2005.01.023.

XIA, Qingsu *et al.* - Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, heliotrine. **Toxicology Letters**. . ISSN 03784274. 178:2 (2008) 77–82. doi: 10.1016/j.toxlet.2008.02.008.

YANG, Mengbi *et al.* - Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: Firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**. . ISSN 18727786. 243:2016) 119–126. doi: 10.1016/j.cbi.2015.09.011.

YANG, Y. C. *et al.* - Metabolic activation of the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid, riddelliine, leading to DNA adduct formation in vivo. **Chem. Res. Toxicol.** 14 (2001) 101–109.