



Carlos Miguel Almeida Meneses

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exposição ambiental, ocupacional e alimentar a produtos fitofarmacêuticos, e suas consequências no desenvolvimento e prevalência de doenças neurodegenerativas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Cláudia Silvestre, da Dra. Liliana Teles e do Professor Doutor Carlos Cavaleiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Carlos Miguel Almeida Meneses

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exposição ambiental, ocupacional e alimentar a produtos fitofarmacêuticos, e suas consequências no desenvolvimento e prevalência de doenças neurodegenerativas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Cláudia Silvestre, da Dra. Liliana Teles e do Professor Doutor Carlos Cavaleiro e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Carlos Miguel Almeida Meneses, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012147145, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Exposição ambiental, ocupacional e alimentar a produtos fitofarmacêuticos, e suas consequências no desenvolvimento e prevalência de doenças neurodegenerativas” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 13 de setembro de 2017.

*Carlos Miguel Almeida Meneses*

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Carlos Cavaleiro por todos os conselhos e conhecimentos transmitidos, essenciais na realização desta dissertação, e pela constante disponibilidade e dedicação com que se apresentou. Estou-lhe deveras grato.

À Dra. Cláudia Silvestre e aos restantes elementos da Farmácia de Celas, a minha gratidão pela forma como fui integrado na equipa, pelo constante apoio e disponibilidade em todas as vertentes, pela brilhante tutoria sob o meu estágio em Farmácia Comunitária e pela sua forma contagiante de trabalho, centrada no utente, que me permitiu perceber a importância da nossa classe na população.

À Doutora Liliana Teles e a toda a equipa da Pharmilab, em especial à Laura Ferreira que me acompanhou desde o primeiro dia no Laboratório de Controlo de Qualidade, um muito obrigado pela simpatia, pelo à vontade que se fazia sentir e por tudo o que me ensinaram nesta área, na qual não tinha qualquer experiência, o que me permitiu crescer pessoalmente e tornar-me um profissional de saúde mais completo.

À minha família, namorada e amigos, pelo apoio incansável, pela confiança e por todos os bons momentos que me proporcionaram ao longo deste período, o meu eterno agradecimento, sem vocês nada disto faria sentido.

A Coimbra, pelo seu significado, simbolismo e por tudo aquilo que me ofereceu nesta longa jornada. Para esta cidade, onde se aprende a dizer saudade, vai o meu maior agradecimento.

# Índice

## Parte I

Introdução .....	9
<b>Pontos Fortes (Strengths)</b> .....	10
1. Equipa acolhedora, profissional e dinâmica .....	10
2. Formação sequencial – do <i>back office</i> ao balcão de atendimento .....	10
3. Funcionalidades do SIFARMA 2000® .....	11
4. Metodologia KAIZEN .....	12
6. Largo espectro de utentes .....	13
7. Preparações extemporâneas e de tratamentos para a infertilidade .....	13
8. Aconselhamento de produtos complementares ao tratamento prescrito .....	13
<b>Pontos Fracos (Weaknesses)</b> .....	14
1. Conferência de receituário .....	14
2. Suplementação .....	14
3. Número de estagiários .....	14
4. Extensão do estágio .....	15
<b>Oportunidades (Opportunities)</b> .....	15
1. Participação em formações .....	15
2. Cartão saúde .....	15
3. Reestruturação do espaço da farmácia .....	16
4. Pedidos de medicamentos sujeitos a Autorização de Utilização Excecional .....	16
<b>Ameaças (Threats)</b> .....	16
1. Perspetiva atual das farmácias .....	16
2. Lacunas do MICF .....	17
3. Esclarecimento da população .....	17
Considerações Finais .....	18
Referências Bibliográficas .....	19
Anexos .....	20

## Parte II

Introdução .....	26
<b>Pontos Fortes (Strengths)</b> .....	27
1. Equipa profissional e dinâmica .....	27
2. Manipulação de cosméticos .....	27
3. Diversidade de tarefas .....	27
4. Controlo microbiológico .....	28
5. Ensaio de estabilidade .....	28
6. <i>Challenge test</i> .....	29
7. Análise e transposição de dados .....	30
8. Compatibilidade entre o MICF e o programa de estágio .....	30
9. Extensão do estágio .....	30
<b>Pontos Fracos (Weaknesses)</b> .....	31
1. Falta de contacto com a área regulamentar .....	31
2. Indefinição sobre métodos protocolares .....	31
<b>Oportunidades (Opportunities)</b> .....	31
1. Testes de performance .....	31
2. Pesquisa e aperfeiçoamento de procedimentos .....	32
3. Controlo de água purificada .....	32
4. Estudos de estabilidade acelerada de dispositivos médicos .....	32
5. Utilização vigorosa da Farmacopeia Portuguesa .....	33
6. Gestão e realização de tarefas de forma autónoma .....	33
<b>Ameaças (Threats)</b> .....	33
1. Subcontratação de laboratórios para realização de ensaios .....	33
2. Concorrência pela área laboratorial .....	34
3. Abordagem da área no MICF .....	34
Considerações Finais .....	35
Referências Bibliográficas .....	36
Anexos .....	37

## Parte III

1. Introdução.....	44
2. Produtos Fitofarmacêuticos.....	45
2.1 Definição.....	45
2.2 Breve Contextualização Histórica.....	45
2.3 Bioconcentração e exposição ambiental.....	46
2.4 Regulamentação de Produtos de Proteção de Plantas.....	47
3. Neurodegenerescência – Evidências de risco.....	48
3.1 A doença de Parkinson como consequência da exposição a fitofármacos.....	49
3.1.1 Transmissão dopaminérgica.....	51
3.1.2 Consequências moleculares e celulares da exposição a Piretróides.....	51
3.1.2.1 Fenpropatrina.....	54
3.1.3 Consequências moleculares e celulares da exposição a Carbamatos.....	56
3.1.3.1 Rotenona.....	56
3.1.3.2 Ziram.....	58
3.1.4 Consequências moleculares e celulares da exposição a Compostos Organoclorados.....	60
3.1.4.1 Dieldrina.....	60
3.1.4.2 Lindano.....	62
3.1.5 Consequências moleculares e celulares da exposição a Bipiridilos.....	63
3.1.5.1 Paraquato.....	63
3.1.6 Evidências epidemiológicas da relação de PF com a doença de Parkinson.....	66
3.2 A doença de Alzheimer como consequência da exposição a fitofármacos.....	69
3.2.1 Evidências epidemiológicas da relação de Produtos Fitofarmacêuticos com a doença de Alzheimer.....	71
4. Conclusão.....	72
Bibliografia.....	74
Anexos.....	80

# **Parte I**

## **Relatório de Estágio de Farmácia Comunitária**

## **Resumo**

O presente estágio, mostrou-se como uma oportunidade de adquirir experiência em contexto profissional após o término da formação teórica e prática, integrada no plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Este é um período caracterizado por crescimento pessoal nas mais diversas competências profissionais, técnico-científicas e humanas. Deste modo, procedeu-se à realização de uma análise SWOT, na qual se evidenciam os pontos fortes, pontos fracos, as oportunidades e as ameaças, que constatei ao longo do período de aprendizagem, enquanto estagiário, na Farmácia de Celas em Coimbra.

**Palavras-chave:** Análise SWOT, Farmácia Comunitária.

## **Abstract**

The present internship, appeared as an opportunity to acquire experience in a professional context, after completing the theoretical and practical program, as part of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra's Pharmaceutical Sciences Master's Degree curricular plan. This is a stage characterized by personal growth in a lot of professional, technical, scientific and human skills. Thusly, a SWOT analysis was made, where the strengths, weaknesses, opportunities and threats, that were observed during the learning period, as an intern, at the Farmácia de Celas in Coimbra are displayed.

**Keywords:** SWOT analysis, Community Pharmacy.

## **Lista de Abreviaturas**

FC – Farmácia de Celas

PDCA – *Plan, do, act, check*

MNSRM – Medicamentos não sujeitos a receita médica

MSRM – Medicamentos sujeitos a receita médica

AUE – Autorização de utilização excepcional

MICF – Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

LEF – Laboratório de Estudos Farmacêuticos

CIMPI – Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada

## Introdução

O estágio em Farmácia Comunitária permite ao estudante do MICF (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) pôr em prova num contexto profissional, todo o conhecimento por ele absorvido ao longo da extensão do curso. Além de dar a oportunidade de acompanhar diariamente a enorme diversidade de tarefas que competem a um farmacêutico comunitário, este estágio em particular, concede-nos uma visão geral da perspetiva atual em que vive todo o setor farmacêutico, nomeadamente as farmácias, das suas dificuldades, necessidades e do nosso hipotético envolvimento neste meio. Esta participação é de extrema relevância para o estagiário, pois geralmente traduz-se num momento de diferenciação e crescimento pessoal a nível técnico-científico, social e etiológico, permitindo a evolução da pessoa a nível das competências profissionais e humanas.

O local escolhido para a realização deste estágio foi a Farmácia de Celas (FC) em Coimbra, sob orientação e tutela da Dra. Cláudia Silvestre e a sua equipa. Nesta, executei tarefas desde a aquisição e gestão de produtos e medicamentos até à sua dispensa ao utente. De maneira simplista estive envolvido nas várias fases do ciclo de vida que os medicamentos e outros produtos dispõem na farmácia. A aprendizagem foi realizada de forma contínua, tendo sempre como foco o utente. Aqui os serviços farmacêuticos destacam-se pela elevada capacidade técnica e profissional marcando a diferença com um aconselhamento personalizado e de excelência, de modo a satisfazer as necessidades dos utentes, pois uma vez mais é bom sublinhar que estes representam a nossa prioridade. Esta filosofia permite por sua vez fidelizar os utentes, sendo este fator de enorme importância para a farmácia.

Este relatório vai ser disposto sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) em que serão considerados fatores internos, ou seja, forças e fraquezas, e fatores externos que envolvem por sua vez as oportunidades e ameaças. É com base nesta ferramenta, que serão apresentados e fundamentados vários pontos pessoais, de forma a permitir uma correta análise e avaliação do modo como o estágio decorreu e foi conduzido.

## **Pontos Fortes (Strengths)**

### **1. Equipa acolhedora, profissional e dinâmica**

No primeiro contacto com a farmácia fui prontamente recebido num ambiente acolhedor por todos os elementos da equipa. Foi-me explicado o modo de funcionamento da farmácia, com a realização de uma visita pelas diferentes áreas da mesma, culminando com uma breve elucidação acerca da atualidade do mundo farmacêutico e da realidade das farmácias. O empenho, dedicação e o espírito vivido entre a equipa proporcionaram uma fácil integração na mesma, fomentando a vontade de aprender com esta, e da obtenção um bom desempenho. A equipa contém um excelente nível organizacional, em que cada colaborador sabe as funções às quais está comprometido.

Um dos aspetos mais relevantes nesta organização é a sua filosofia de melhoria contínua, que origina uma dinâmica incrível. A procura pela melhoria tanto ao nível dos serviços disponibilizados, como pessoal, permite o crescimento de todos os envolvidos, garantindo um serviço de qualidade para o utente.

O modo como fui acompanhado, com a constante disponibilidade de todo o pessoal para responder a dúvidas, fornecer explicações ou materiais de apoio caso necessário, deu origem a um ambiente que me foi favorável à evolução como pessoa e como futuro profissional de saúde.

### **2. Formação sequencial – do *back office* ao balcão de atendimento**

O trajeto realizado de forma sequencial permitiu diminuir o choque ao enfrentar uma nova realidade. Para além desse aspeto, sendo o estágio dividido em 3 fases, abordaram-se todas as valências necessárias para desempenhar cada tarefa, o que se refletiu numa aprendizagem mais consistente.

Na primeira fase, fiquei encarregue de tarefas relacionadas com o *back office*, ou seja, gestão de *stocks* e prazos de validade, receção de encomendas, regularização e realização de notas de devolução, arrumação correta de produtos e medicamentos, exploração das potencialidades do SIFARMA 2000®, entre outras. Deste modo tive uma maior perceção de todo o ativo que entra na farmácia, familiarizando-me com o mesmo, e uma maior compreensão das tarefas e dificuldades aqui encontradas. A perceção dos produtos e alternativas presentes na farmácia, facilitou futuramente a tarefa de aconselhamento e atendimento, permitindo a sua realização com melhor desempenho. Esta é uma das fases mais importantes, pois traduz-se muitas vezes no primeiro contacto com a atividade, onde se começa a associar a designação por marca dos medicamentos aos respetivos princípios ativos, e se percebem as regras para um bom funcionamento da farmácia.

Numa fase posterior, comecei a assistir a atendimentos. Esta etapa é crucial para o nosso desenvolvimento, pois é aqui que adquirimos conhecimento acerca da forma como se conduz todo o processo de atendimento, incluindo a realização de vendas, e ainda melhoramos as nossas capacidades técnico-científicas através da observação e escuta de aconselhamentos nos diferentes casos que vão surgindo. Esta preparação mostrou ser imprescindível na fase seguinte.

Por último, após ter sido feita uma correta preparação, assumi uma posição no balcão de atendimento. Esta fase traz ao futuro profissional de saúde um acréscimo de responsabilidade e um momento de enorme pressão, pois simboliza o contacto individual com o utente, colocando em prática os seus conhecimentos adquiridos ao longo do curso e do presente estágio. É também neste período que nos apercebemos das nossas maiores dificuldades e em que existe um maior número de dúvidas, às quais a equipa se mostrou sempre disponível para responder. Ao ganhar uma maior experiência neste campo, senti um aumento de motivação e confiança em mim próprio e uma maior independência em relação aos outros profissionais de saúde. Esta fase permitiu-me também desenvolver a forma de comunicação, o que se traduziu gradualmente, numa melhor capacidade de fundamentação e relação com os utentes, bem como numa melhoria geral do processo de atendimento.

### **3. Funcionalidades do SIFARMA 2000®**

O SIFARMA 2000® é um programa utilizado pela maioria das farmácias, incluindo a FC, que possui diversas ferramentas imprescindíveis à atividade farmacêutica [1]. É neste sistema operativo que se executam tarefas relacionadas com a gestão de encomendas e de stocks, realização de vendas, gestão de devoluções, comunicação imediata com os fornecedores, conferência de receituário, faturação e gestão do inventário. Entre estas, encontram-se outras tarefas relevantes para uma boa gestão da farmácia, como a possibilidade de criação de fichas de cliente e assinalar os respetivos perfis comerciais, fazer o acompanhamento farmacêutico de determinado utente, e ainda verificar o histórico de vendas.

Como estagiário, este sistema operativo foi objeto de extensa exploração, com abordagem e utilização da grande maioria das suas funcionalidades. A informação científica disponível neste foi particularmente de grande utilidade, pois algumas noções farmacológicas referentes ao grupo farmacológico dos medicamentos, posologia e interações entre fármacos encontravam-se em falta.

Este programa veio então facilitar a atividade farmacêutica, sendo atualizado constantemente com o desenvolvimento de novas funcionalidades. Recentemente foi

desenvolvida uma nova extensão deste sistema, denominada de SIFARMA GEST, a qual permite realizar uma gestão mais detalhada da farmácia.

#### **4. Metodologia KAIZEN**

A filosofia KAIZEN, vem impor uma perseguição por um estado de melhoria contínua aos locais onde é aplicada. A própria formação da palavra descodifica o seu objetivo, pois deriva da palavra *kai* que significa melhor e da palavra *zen* cujo significado é mudança [2]. Esta metodologia vem por sua vez aperfeiçoar a organização da farmácia, com identificação de potenciais fontes de melhoria, e deste modo garantir uma melhor gestão de recursos e oferecer um serviço mais eficiente, acentuando um ganho de produtividade e rentabilidade.

Na farmácia foram realizadas diversas modificações ou acréscimos de modo a alcançar os objetivos propostos por esta filosofia. A criação de um quadro que continha um ciclo PDCA para cada colaborador, as campanhas em vigor no momento e os objetivos semanais a alcançar, juntamente com os respetivos resultados foi, na minha opinião uma mais-valia, pois deu a oportunidade a cada elemento de perceber o desenvolvimento diário da farmácia, relembrar tarefas que se encontrem esquecidas ou, em que não houve progressos, e campanhas que estejam em vigor que sejam convenientes abordar com os utentes. A existência de reuniões rápidas onde se debatiam novas ideias e questões, e a conceção de um *cockpit* perto do balcão de atendimento, com os medicamentos que registavam maior saída na farmácia, permitiram melhorar a produtividade e manter o foco no utente.

#### **5. Observação e preparação de medicamentos manipulados**

A intensa observação e preparação de medicamentos manipulados ao longo do estágio na FC, foi de enorme importância para compreender todo o processo de manipulação de medicamentos que cabe ao farmacêutico, como também melhorar as técnicas essenciais na produção dos diferentes manipulados.

Este processo, envolve a elaboração de uma ficha de preparação (Figura 1), com informações sobre o utente e o médico prescritor, a designação do manipulado, as matérias-primas utilizadas e as características organolépticas das fórmulas magistrais, não obstante da nomeação dos cuidados especiais que a formulação resultante, necessita para garantir a sua eficácia e segurança. É necessário, para além da informação descrita anteriormente, realizar o cálculo do preço do manipulado de acordo com determinados fatores descritos por lei (Figura 2) e a preparação do respetivo rótulo.

No caso de dúvidas, ou necessidade de esclarecimentos na preparação dos manipulados, fomos incitados a contactar o Laboratório de Estudos Farmacêuticos (LEF), que disponibiliza

um serviço denominado de Centro de Informação de Medicamentos de Preparação Individualizada (CIMPI) [3].

## **6. Largo espectro de utentes**

O facto de existir uma grande heterogeneidade de utentes que se encaminha à FC, fez com que esta atividade se tornasse mais desafiante, pois é fulcral procurar corresponder às inúmeras necessidades dos utentes, mais interessante e menos repetitiva. Ao encarar diversas patologias, e uma diferente procura de produtos e serviços por parte do utente, é imprescindível ter um vasto conhecimento sobre todos os produtos e medicamentos existentes na farmácia, identificar o mais adequado e procurar explorar e expandir o nosso conhecimento sobre certas condições fisiológicas, de modo a que no próximo atendimento tenhamos uma melhor *performance* e que o utente saia da farmácia com um melhor serviço e maior satisfação.

## **7. Preparações extemporâneas e de tratamentos para a infertilidade**

Enquanto estagiário, fui confrontado com imensas situações nas quais era necessário realizar a preparação de medicamentos. Neste campo estão incluídas as preparações extemporâneas e de tratamentos para o combate à infertilidade.

As preparações extemporâneas realizadas, incluíram a reconstituição de antibióticos, que por vezes necessitam de advertências especiais a comunicar ao utente, após a sua preparação, sendo que a maioria dos utentes optava por levar já o medicamento preparado, traduzindo confiança no serviço prestado pelo farmacêutico. Por sua vez, alguns tratamentos para o combate à infertilidade, necessitam de ser preparados, pois encontram-se na forma de um pó, ao qual se adiciona um solvente para sua dissolução, para de seguida serem administrados na forma de injetável. Estes são produtos que devem ser mantidos sob condições especiais de temperatura após a sua preparação para garantir a sua estabilidade e consequente eficácia.

Deste modo foi necessário aprender a forma de preparação destes produtos, as suas características e os cuidados a ter no seu armazenamento e utilização, de forma a transmitir esta informação de forma inequívoca aos utentes.

## **8. Aconselhamento de produtos complementares ao tratamento prescrito**

Como farmacêuticos, temos de possuir a capacidade de analisar e olhar para lá do tratamento prescrito pelo médico e estar preparados para aconselhar produtos complementares a este. Este aconselhamento traduz-se por vezes na realização de vendas

cruzadas, que são importantes para assegurar uma boa recuperação e/ou diminuir certos efeitos secundários da medicação principal. Foi deste modo, importante estudar e conhecer possíveis tratamentos adjuvantes de acordo com as necessidades do utente, tendo sempre como objetivo facultar um atendimento completo e profissional que vise a sua satisfação.

## **Pontos Fracos (Weaknesses)**

### **1. Conferência de receituário**

A conferência de receitas pertencentes aos diferentes planos de comparticipação existentes, foi uma tarefa que não foi realizada frequentemente e que pessoalmente gostaria de ter abordado de outra forma. Este facto foi exacerbado pela crescente desmaterialização das receitas, ou seja, devido à sua nova forma de apresentação. A baixa utilização do SIFARMA 2000® para conferência de receituário, e o respetivo fecho de lotes, são um ponto a considerar como fraqueza pois não surgiu a oportunidade de o concretizar, sendo uma tarefa que eu adjetivo como relevante na formação de um profissional de farmácia.

### **2. Suplementação**

A suplementação é uma área muito relevante na farmácia comunitária, pois é para a farmácia que as pessoas se dirigem em busca de suplementos. Esta é uma área com grande procura, mas que contém uma enorme diversidade de produtos, o que dificulta bastante o aconselhamento farmacêutico. Ao longo do estágio, foi-me por vezes difícil aconselhar este tipo de produtos, dada a grande quantidade de produtos com a mesma finalidade e o facto de por vezes a necessidade do utente não ser óbvia. Na minha opinião, os diferentes tipos de suplementos, deveriam ser rigorosamente estudados e compreendidos (a nível de interações) para que o produto aconselhado seja correto, eficaz e seguro. Considerei este aspeto como fraco pois não me senti totalmente preparado para tal.

### **3. Número de estagiários**

O excesso simultâneo de estagiários, implicou uma maior capacidade de organização de tarefas na FC, de modo a que todos tivessem a oportunidade de abordar extensamente todas as áreas e conhecer as suas implicações. Contudo, por vezes, a realização independente de funções e o tempo disponível ao balcão, eram afetados por este mesmo motivo. Pessoalmente, penso que um cenário com um menor número de estagiários, permitiria obter uma aprendizagem mais completa e consistente.

#### **4. Extensão do estágio**

Apesar da nossa experiência profissional ser proveniente do tempo de estágio, como opinião pessoal, achei este período demasiado longo, na medida em que torna difícil a realização de um outro estágio numa outra área devido, fundamentalmente, aos limites de horas impostos. Este cenário, obriga por vezes a realização de mais de 8 horas de trabalho diárias, e no caso de querer participar em formações em horário pós-laboral, acaba-se por induzir uma sensação de cansaço que prejudica a capacidade de aprendizagem e eficiência.

Um número mais reduzido de horas, traria vantagens a ambas as partes, pois permitiria uma melhor organização do plano de estágio, pois no caso de haver múltiplos estagiários por farmácia, poder-se-ia repartir o seu tempo de funcionamento pelos mesmos e deste modo facilitar e melhorar a sua aprendizagem, existiria mais tempo livre para a realização do respetivo relatório, e ainda tornaria o estágio menos cansativo garantindo uma melhor prestação pelos futuros profissionais de saúde.

### **Oportunidades (*Opportunities*)**

#### **1. Participação em formações**

Enquanto estagiário, tive a oportunidade de participar em diversas formações patrocinadas por laboratórios. As formações permitiram acompanhar diversos produtos de várias marcas como por exemplo a Medela<sup>®</sup>, e abrangendo temas como: a suplementação na grávida, a higiene buco-dentária, casos práticos de otorrinolaringologia e oftalmologia, anti-histamínicos e antiparasitários. Para além destas, também foram recebidas formações internas pelos delegados de saúde sobre diversos produtos ou marcas, como é o exemplo da Advancis<sup>®</sup>, Fucidine<sup>®</sup>, super alimentos da Fold<sup>®</sup>, entre outras.

Todas estas formações vieram complementar o meu conhecimento acerca dos diferentes temas e produtos, garantindo um melhor desempenho na prática farmacêutica, nomeadamente no aconselhamento de produtos ou patologias que haviam sido abordadas, deixando-me mais à vontade e confiante nas minhas competências.

#### **2. Cartão saúde**

O cartão saúde desenvolvido pela organização das Farmácias Portuguesas, é uma ferramenta útil de fidelização do cliente, funcionando também como chamariz, atraindo a atenção dos utentes para a farmácia ao invés de outros pontos de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). O processo envolve a acumulação de pontos no

cartão, por cada receita dispensada e pela compra de MNSRM ou outros produtos. Estes pontos podem ser rebatidos na forma de vale ou na troca direta por produtos [4].

A existência deste cartão é aproveitada ao máximo na FC, pois muitas vezes, era uma forma de melhorar a relação com o utente, já que como é um serviço gratuito, permite ao utente levar mais um produto sem custos adicionais. Deste modo, a impressão do utente sobre a própria farmácia e os seus elementos acaba por melhorar, ajudando ao processo de fidelização.

### **3. Reestruturação do espaço da farmácia**

De forma a melhorar a organização e dinâmica do espaço de atendimento, e a facilitar a localização de produtos ou identificação da sua categoria/finalidade por parte do utente, foi realizada a reforma deste espaço. Esta envolveu a individualização das várias áreas da farmácia, como a higiene buco-dentária, bebé e mamã, cabelos, ortopedia e espaço animal. Por sua vez, cada área foi organizada por diferentes categorias dependendo da finalidade dos produtos.

As alterações efetuadas, promoveram uma melhor orientação dos utentes na farmácia, pois prontamente percebiam a localização dos produtos que pretendiam, o que facilitava também o trabalho do farmacêutico, pois dessa forma percebia-se facilmente a intenção do utente, permitindo uma melhor abordagem. Estas modificações, promovem um contacto direto entre as pessoas e os produtos acabando por potenciar as vendas.

Outra medida adotada foi a marcação dos produtos no SIFARMA2000<sup>®</sup> consoante a categoria a que pertencem, o que permitiu verificar após algum tempo, os resultados da dinamização do espaço e o seu efeito económico, possibilitando uma melhor gestão do mesmo.

### **4. Pedidos de medicamentos sujeitos a Autorização de Utilização Excecional**

Ao longo do período de estágio deparei-me com alguns pedidos de medicamentos sujeitos a AUE, nomeadamente de pilocarpinas para o tratamento do glaucoma. Percebi então de uma forma geral, os requisitos necessários para obter esta autorização, e o modo como se processa o pedido destes medicamentos para uma correta dispensa ao utente.

## **Ameaças (*Threats*)**

### **I. Perspetiva atual das farmácias**

O sector das farmácias não vive os seus melhores dias, as margens de lucro encontram-se diminuídas, tal se deve à descida dos preços dos medicamentos e das taxas de comparticipação. Estes fenómenos, aliados a um menor poderio económico da população em geral, e a uma

maior competitividade proveniente de outros pontos de venda de MNSRM e espaços de saúde em grandes superfícies comerciais, tornam o cenário mais obscuro.

Esta situação, torna cada vez mais difícil o ingresso da população na farmácia, prejudicando o seu *modus operandi* e levando à diminuição da sua rentabilidade. Consequentemente existe uma menor possibilidade de emprego para novos farmacêuticos que têm de se adaptar às novas exigências do mercado e tentarem-se diferenciar e formar noutros campos.

## **2. Lacunas do MICF**

A nível de formação, o MICF é dos cursos mais completos, pois abrange diversas áreas nas quais os alunos ganham fortes competências. Isto permite uma entrada competitiva e uma rápida adaptação a diversos cargos de trabalho. Apesar disso, existem algumas lacunas no curso que se verificam quando nos colocamos à experiência. Neste estágio fui capaz de denotar fracas competências na capacidade de aconselhamento de cosméticos, suplementos, produtos dermatológicos, soluções oculares, produtos de ortopedia e puericultura. Penso que estes temas deveriam possuir um maior foco, nomeadamente as questões suplementares, dermatológicas e oculares, pois aparecem com elevada frequência na farmácia. Ao oferecer um maior destaque a estes temas, garantia-se uma maior facilidade em lidar com o aparecimento destes casos, com realização de um diagnóstico mais fiável e com melhorias na qualidade do atendimento.

## **3. Esclarecimento da população**

Os utentes, por vezes são a principal barreira a um bom desempenho dos profissionais de saúde, pois muitas vezes não compreendem os procedimentos básicos do sistema nacional de saúde em torno das receitas, como a necessidade de receita para levantar os medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM). A existência contínua do mito genérico vs marca, de casos de rutura de *stocks* de medicamentos, ou mesmo a desatualização dos valores da comparticipação nas receitas, são fontes de desentendimento entre os utentes e os farmacêuticos, que por vezes levam à descredibilização da nossa classe por parte da população, e que tornam todo o nosso trabalho mais complexo. Seria de grande utilidade a criação de um cenário de apelo à promoção de educação básica da população nesta matéria, com esclarecimento de casos, como os referidos anteriormente. Esta medida traria benefício para toda a população, em especial para a classe farmacêutica e para as farmácias.

## **Considerações Finais**

A realização do estágio em farmácia comunitária, para além de possibilitar o contacto direto com a profissão, faculta um meio de desenvolvimento pessoal e técnico-científico necessário para a formação de um bom profissional de saúde. Juntamente com o ambiente que se vive na Farmácia de Celas, em que existe uma enorme solidariedade entre os diversos elementos e em que o espírito de equipa é notório, as condições são favoráveis ao crescimento.

A experiência ganha durante o período de estágio foi enorme, pois tive a oportunidade de desempenhar a maioria dos serviços farmacêuticos, aprendendo mais sobre cada um deles. Senti particularmente, melhorias nas competências sociais, pois o contacto com o utente é de extrema relevância e para isso tive de ser mais desinibido e confiante. Além de um acréscimo de responsabilidade, esta função obriga-nos a melhorar continuamente, pois surgem sempre novidades, ou situações não expectáveis. Para combater esta situação foi necessário melhorar não só a capacidade de argumentação, mas também o sentido crítico em relação aos factos.

As maiores dificuldades foram sentidas a nível do aconselhamento de utentes, pois as bases técnico-científicas falham em alguns campos. No meu caso, reconheço falhas principalmente ao nível do aconselhamento dermatológico. Penso que só com um maior estudo desta área e uma maior experiência nestes casos, é que conseguirei progredir neste campo.

De uma forma geral penso que tive um bom desempenho como estagiário, desenvolvi e melhorei muitas competências, e estando numa farmácia que prioriza o utente e em que a máxima reverte para a satisfação do mesmo, fez-me perceber os objetivos da nossa classe e de ter vontade de lutar por estes.

## Referências Bibliográficas

[1] Glintt - **SIFARMA** [Acedido a 14 de agosto de 2017] Disponível na Internet: <http://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>

[2] *Kaizen institute* - **Missão do Kaizen institute** [Acedido a 15 de agosto de 2017] Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/home.html>

[3] LEF - **Medicamentos Manipulados** [Acedido a 15 de agosto de 2017] Disponível na Internet: [http://www.lef.pt/pt/servicos/Paginas/Medicamentos\\_Manipulados.aspx](http://www.lef.pt/pt/servicos/Paginas/Medicamentos_Manipulados.aspx)

[4] Farmácias Portuguesas - **Como funciona o cartão Saúda?** [Acedido a 14 de agosto de 2017] Disponível na Internet: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/sauda/como-funciona>

## Anexos

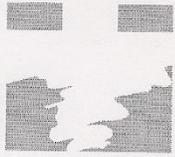
### Casos clínicos:

- 1) O sr. J.P., com cerca de 30 anos, chegou à farmácia e queixava-se de uma crise hemorroidária. Alegava que já tinha utilizado várias pomadas para o efeito e que nenhuma tinha resultado. Deste modo, para além de lhe referir várias ações não farmacológicas, como evitar o consumo de especiarias, álcool e café, fazer banhos de assento em água tépida ou lavagem do local com água fria em caso de nova crise, aconselhei-lhe uma pomada rectal à base de ácido hialurónico, o Proktis-M.<sup>®</sup> O ácido hialurónico atua como reparador do canal rectal acelerando o processo de recuperação. Passado umas semanas o mesmo senhor veio à farmácia para comprar mais uma embalagem para o seu pai, que havia tido o mesmo problema, visto que com ele tinha resultado muito bem.
- 2) A senhora C.S. de aproximadamente 40 anos, chegou à farmácia e queria algo que a ajudasse a adormecer é ter um sono mais profundo, visto que ultimamente andava num estado de maior stresse. Disse que já tinha utilizado Valdispert<sup>®</sup> 45mg, mas que não tinha sentido qualquer efeito. Mostrei-lhe então diversas alternativas, entre elas, o Absorvit<sup>®</sup> Passival Sono, à base de melatonina e extratos de plantas como a valeriana, passiflora e o lúpulo. Em combinação, os compostos presentes nesta composição, ajudam a adormecer mais rapidamente, regular o sono e diminuir a ansiedade. Após a explicação sobre o funcionamento deste suplemento alimentar, a senhora optou por levar e experimentar, tomando 1 cápsula por dia ao deitar.
- 3) A senhora M.C com cerca de 45 anos, chegou à farmácia queixando-se que sofria de infeções urinárias frequentemente e que ia daí a três semanas numa viagem para o estrangeiro e queria algo que reduzisse o risco de ter uma infeção durante a sua estadia lá fora. Aconselhei-lhe então um dispositivo médico à base de extrato de arando americano, o Roter Cystiberry<sup>®</sup>, comunicando que o tratamento preventivo era realizado através da toma de 1 cápsula por dia durante 30 dias. Devido às recorrentes infeções, aconselhei a utente a aumentar as medidas de higiene na zona em causa e caso tivesse sintomas relacionados com a infeção urinária, deveria também aumentar a ingestão de água, pois ajudava na hidratação local e a remover o agente infeccioso.

## Figuras

(carimbo da Farmácia)

**FICHA DE  
PREPARAÇÃO**



---

N.º MANIPULAÇÃO (LOTE) \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

MATÉRIAS-PRIMAS	N.º DO LOTE/VALIDADE	FUNÇÃO	BOLETIM DE ANÁLISE	QUANTIDADE PESADA

**PROCEDIMENTO DE MANIPULAÇÃO**  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**ACÇÃO FARMACOLÓGICA**  
 \_\_\_\_\_

**CONDIÇÕES DE CONSERVAÇÃO –**  
 Temperatura Ambiente       Frio [2º - 5º C]       Frasco de vidro bem fechado  
 Agitar antes de usar       Abrigo da luz       Recipiente opaco e bem fechado

**PRAZO DE UTILIZAÇÃO –**  
 \_\_\_\_\_

**NOME –** \_\_\_\_\_  
**MORADA –** \_\_\_\_\_  
**NOME DO PRESCRITOR –** \_\_\_\_\_

**CONTROLO DO PRODUTO ACABADO**

CARACTERÍSTICAS	RESULTADO
CARACTERES ORGANOLÉPTICOS (COR, CHEIRO, ASPECTO GERAL, ETC.)	
PH	
QUANTIDADE/ MASSA/ VOLUME CONFORME PRESCRIÇÃO	

**ANEXOS**  
 RECEITA MÉDICA       ANEXO COM MÉTODO DE PREPARAÇÃO       OUTRO

Figura I: Ficha de preparação de manipulados.

## CÁLCULO DO PREÇO DE VENDA

### MATÉRIAS -- PRIMAS

MATÉRIAS-PRIMAS	EMBALAGEM EXISTENTE EM ARMAZÉM		PREÇO DE AQUISIÇÃO DE UMA DADA QUANTIDADE UNITÁRIAS (S/ IVA) (€)		QUANTIDADE A USAR	FACTOR MULTIPLICATIVO	PREÇO DA MATÉRIA--PRIMA UTILIZADA NA PREPARAÇÃO
	QUANTIDADE ADQUIRIDA	PREÇO DE AQUISIÇÃO (S/ IVA)	QUANTIDADE UNITÁRIA	PREÇO			
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
					X	X	=
<b>SUBTOTAL A</b>							

### HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO

	FORMA FARMACÊUTICA	QUANTIDADE	F (€)	FACTOR MULTIPLICATIVO	VALOR
VALOR REFERENTE À QUANTIDADE BASE				X	=
VALOR ADICIONAL			X	X	=
<b>SUBTOTAL B</b>					

### MATERIAL de Embalagem

MATERIAL DE EMBALAGEM	PREÇO DE AQUISIÇÃO (S/ IVA)	QUANTIDADE	FACTOR MULTIPLICATIVO	VALOR
		X	x 1,2	=
		X	x 1,2	=
		X	x 1,2	=
		X	x 1,2	=
<b>SUBTOTAL C</b>				

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO

(A + B + C) x 1,3

+ IVA

D

### DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO

DISPOSITIVO	PREÇO UNITÁRIO	QUANTIDADE	VALOR
<b>E</b>			

Preço Final (D + E)

OPERADOR - \_\_\_\_\_

SUPERVISOR - \_\_\_\_\_

RUBRICA DIRECTOR TÉCNICO

DATA

Figura 2: Ficha para o cálculo do preço de venda do manipulado.

# **Parte II**

## **Relatório de Estágio de Indústria**

## **Resumo**

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, é um curso com um conteúdo programático extenso, que aborda múltiplas áreas do medicamento. A realização de um estágio em Indústria Farmacêutica, permitiu-me conhecer e aprofundar conhecimentos de domínio industrial desenvolvidos durante o mestrado e contactar com uma área na qual não tinha qualquer experiência. Na qualidade de estagiário, ingressei na Pharmilab, onde desempenhei funções na área laboratorial, nomeadamente no Controlo de Qualidade de produtos cosméticos, pois este é o seu *ex-libris*. Neste, exerci múltiplas tarefas, que foram abordadas sob a forma de uma análise SWOT, na qual se evidenciam os pontos fortes, pontos fracos, as oportunidades e as ameaças, que se constataram ao longo desta fase de crescimento pessoal e profissional.

**Palavras-chave:** Análise SWOT, Indústria, Controlo de Qualidade, Cosméticos.

## **Abstract**

The Pharmaceutical Sciences Master's Degree of the Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra, is a course with a wide program content that discuss multiple drug areas. Doing an internship in the Pharmaceutical Industry enabled me to understand and extend the knowledge about the industrial domain that is approached during the Master's, and get in touch with an area in which I had no experience. In the quality of an intern, I joined Pharmilab, where I played a role in the laboratorial area, particularly in the Quality Control of cosmetic products, which is the company *ex-libris*. Here, I executed multiple tasks that are discussed as a SWOT analysis where the strengths, weaknesses, opportunities and threats recognized during this personal and professional growth period are highlighted.

**Keywords:** SWOT analysis, Industry, Quality control, Cosmetics.

## Lista de Abreviaturas

PHL – Pharmilab

IPN – Instituto Pedro Nunes

IF – Indústria Farmacêutica

CQ – Controlo de qualidade

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

EE – Ensaio de Estabilidade

FQ – Físico-Químicas

CO – Características organoléticas

EM – Ensaio Microbiológico

CT – *Challenge test*

PT – *Performance test*

TSA – *Trypticase Soy Agar*

SDA – *Sabouraud Dextrose Agar*

PAO – Período após abertura

DMD – Data de durabilidade mínima

## **Introdução**

A Pharmilab (PHL) é uma empresa de consultoria especializada na área de produtos cosméticos e está sediada no Instituto Pedro Nunes (IPN), em Coimbra. O IPN é uma instituição sem fins lucrativos que tem por objetivo promover uma cultura de inovação, qualidade, rigor e empreendedorismo, oferecendo suporte às empresas a nível de acesso ao sistema científico e tecnológico, e proporcionando um meio favorável de contacto com mercados nacionais e internacionais, contribuindo para ao seu crescimento [1].

O estágio em indústria farmacêutica (IF), ofereceu-me a oportunidade de contactar com esta área, na qual não possuía qualquer tipo de experiência e era da minha vontade a sua exploração. Cada vez mais, o trabalho de um farmacêutico se distancia mais da sua profissão direta, farmacêutico comunitário, talvez devido às suas capacidades e competências que vão para além desta, o que se traduz numa procura e enquadramento noutras áreas relacionadas com o perfil farmacêutico.

Assim, optei pela PHL, pois era uma forma de descobrir e analisar o mundo da IF, com obtenção de experiência e vantagem competitiva neste campo. Sendo os produtos cosméticos, o seu objeto de trabalho fundamental, reconheci que seria uma oportunidade interessante de promover o meu conhecimento nesta área. Para além disso, a abordagem desta empresa a outras áreas relevantes, como os dispositivos médicos [2], representa a dinâmica e a aposta da mesma em mercados em crescimento.

Na organização, durante o período de estágio, fui encarregue de desempenhar funções laboratoriais, no âmbito do controlo de qualidade (CQ). Este presente relatório, será dirigido sob a forma de uma análise SWOT, em que serão evidenciados determinados aspetos, apurados durante os 3 meses como estagiário na PHL.

## **Pontos Fortes (Strenghts)**

### **1. Equipa profissional e dinâmica**

A equipa da PHL, mostrou-se muito recetiva e participativa no acompanhamento do seu estagiário. O empenho, disponibilidade e dedicação dos colaboradores desta jovem empresa em crescimento, tornaram todo o processo de adaptação mais rápido do que o esperado, e facultaram um meio de crescimento pessoal a todos os níveis. Sendo uma área em que não tinha qualquer tipo de experiência ou contacto anterior, o ambiente gerado pelos seus elementos, para além de me auxiliar no processo de adaptação, permitiu-me dar lugar ao meu espírito crítico e aumentar o meu grau de confiança em mim mesmo ao desempenhar certas tarefas, o que motivou a aprendizagem.

Esta equipa distingue-se pela sua competência, profissionalidade e dinamismo. Apesar de existir uma divisória entre a área regulamentar e a do CQ, é indispensável a colaboração e comunicação entre ambas as partes para o sucesso das tarefas, o que evidencia uma boa organização e dinâmica de trabalho.

### **2. Manipulação de cosméticos**

A realização deste estágio permitiu-me um maior contacto com produtos cosméticos e as suas diferentes formulações. A constante manipulação destes, possibilitou, a compreensão dos diversos procedimentos a ter em conta no seu CQ, bem como relacionar as características do produto à sua finalidade e antecipar os resultados obtidos em cada análise. Deste modo apurei a minha visão e alarguei os meus conhecimentos sobre esta área que havia sido escassamente abordada no programa contemplado no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

### **3. Diversidade de tarefas**

A prática do CQ de cosméticos requer uma ampla diversidade de tarefas, das quais fazem parte os ensaios de estabilidade (EE), testes de eficácia do conservante (*challenge test*), avaliação de características físico-químicas (FQ) e ensaios microbiológicos (EM). Para além da análise desta classe de produtos, concretizei inúmeros testes que são integrados no controlo de águas e dispositivos médicos, e executei testes de performance (PT), dos quais são alvo maioritariamente, produtos de lide doméstica. Desta forma, os conhecimentos adquiridos foram vastos, com abrangência sob diversas áreas, o que tornou toda a prática interessante, enriquecedora e não repetitiva.

#### 4. Controlo microbiológico

Um dos principais parâmetros a ser analisados em cosméticos é o seu perfil microbiológico. Após a entrada do produto no laboratório era realizada a amostragem para controlo microbiológico antes e após do produto ser sujeito ao EE, caso este fosse requerido. Caso o produto chegasse sob forma de produto acabado, fase anterior à sua colocação no mercado, este ensaio também era realizado, de modo a perceber se o produto se enquadrava com os requerimentos básicos necessários para ser disponibilizado ao consumidor.

Para a realização deste controlo, era necessária a preparação de meios de crescimento não seletivos para bactérias, fungos e leveduras. O meio propício para o crescimento de bactérias é o TSA, enquanto que para o desenvolvimento de fungos e leveduras é o SDA. Era então efetuada a técnica de inoculação em profundidade, colocavam-se as placas de Petri nas estufas apropriadas, pois cada microrganismo tem condições específicas de crescimento. Dependendo da taxa de crescimento dos mesmos, realizava-se por fim a contagem de colónias de modo a determinar se a presença destas se encontrava dentro dos limites propostos.

Aquando da realização dos EE, era identicamente efetuado um controlo microbiológico mais específico, no qual se usam meios nutritivos específicos para detetar a presença de certas estirpes como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*.

Foi desta forma empregue todo o conhecimento teórico e prático em microbiologia proveniente do MICF, sendo que este se tornou mais sólido e amplo ao longo do estágio.

#### 5. Ensaio de estabilidade

Os produtos submetidos aos EE para além das próprias embalagens são divididos por recipientes, que por sua vez são colocados a diferentes temperaturas, 5°C, 25°C e 40°C, respetivamente. Caso a embalagem seja transparente, esta será também colocada num espaço denominado de *window*, com emissão de raios UV para determinar se a luz solar é capaz de provocar alterações no produto. Este ensaio tem a duração de 3 meses e permite testar o produto em condições de envelhecimento acelerado e verificar a compatibilidade entre a formulação e a embalagem primária. Ao longo destes 3 meses são realizados múltiplos ensaios físico-químicos, nomeadamente no tempo zero, ou seja, no momento em que o produto é recebido, na 4ª e 8ª semana e ainda no final dos 3 meses. Para além das características organoléticas (CO) dos produtos (Figuras 1 e 2 - Anexos), os ensaios podem incluir a determinação de pH, viscosidade, densidade e observação de alterações na massa do produto [3].

Como verificação da estabilidade de uma formulação, existem outros procedimentos que permitem averiguar esta característica. Entre eles estão o teste de stresse e o teste de ciclos.

No teste de stresse, uma amostra do produto é colocada sob condições de stresse (Figura 3 - Anexos), através da sua centrifugação a 3000rpm durante 30 minutos, enquanto que o teste de ciclos consiste na sua submissão a variações bruscas de temperatura através do seu congelamento e descongelamento. Este último é realizado durante 5 dias nos quais o produto é colocado a uma temperatura de congelamento durante 7 horas diárias. Após a execução de cada um destes testes é necessária uma análise das CO da amostra.

A realização destes ensaios possibilitou uma compreensão geral sobre os métodos utilizados, perceber as alterações que estes tipos de produtos podem sofrer e que conclusões podemos retirar deste ensaio, como o período após abertura (PAO) e os cuidados necessários a ser incluídos na rotulagem.

## 6. Challenge test

Este procedimento tem como objetivo determinar a eficácia do conservante utilizado na formulação de determinado produto. Para tal é necessário efetuar a amostragem dos diversos produtos incluídos neste teste, que posteriormente serão contaminadas com uma concentração conhecida de colónias, pertencentes a diferentes estirpes de microrganismos (*P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. brasiliensis*). Este teste passa primariamente por determinar a eficácia do neutralizador, de modo a perceber a quantidade de colónias que cresce inicialmente em cada amostra contaminada quando o seu conservante é neutralizado, sendo o teste válido quando existe o crescimento de pelo menos 50% das colónias inoculadas. As amostras inoculadas são então armazenadas à temperatura ambiente num local privado de luz solar, sendo retiradas ao dia 2, 7, 14 e 28 após a sua contaminação, para novo teste. Nestes dias, uma porção de cada amostra contaminada é retirada para um tubo (*falcon*), sendo neutralizada e sujeita a um ensaio microbiológico ao qual se segue a contagem do número de colónias. Durante os 28 dias que se seguem à contaminação das amostras é esperada uma diminuição significativa no número dos diferentes microrganismos, mostrando a eficácia do conservante.

Este procedimento mostrou ser um dos mais desafiantes que tive a oportunidade de realizar. Exige muita concentração e uma ótima gestão de tempo pois é um teste muito minucioso. Deste modo fui colocado à prova nestes mesmos pontos, o que me tornou mais eficiente ao longo do estágio.

Os resultados puderam ser acompanhados através da elaboração de um gráfico da redução logarítmica da concentração de colónias vs tempo (Figura 4 - Anexos), o que facilitou a análise dos mesmos e a devida formulação de conclusões.

## **7. Análise e transposição de dados**

Apesar da maior parte do estágio ser concentrado no laboratório, ao final do dia era dedicado algum do tempo para análise e transposição de dados para elaboração de relatórios ou certificados de análise, como também organizar as tarefas para o dia seguinte. Os resultados obtidos eram transferidos para uma base de dados desenvolvida pela própria empresa que após a compilação de todos os dados, emitia um relatório de acordo com o pretendido. Esta fase deu-me oportunidade de trabalhar neste sentido e de ser mais crítico com os resultados obtidos, percebendo possíveis fontes de erro e que resultados seriam de esperar. De um modo geral, neste período, colocava todas as dúvidas que possuía, planeava e organizava as próximas tarefas e auxiliava na elaboração de vários tipos de documentos. Considero esta fase como muito importante para o desenvolvimento e aprendizagem pessoal, mas também para compreender todo o funcionamento da empresa.

## **8. Compatibilidade entre o MICF e o programa de estágio**

O conteúdo programático presente no MICF funcionou como uma alavanca na realização deste estágio. O conhecimento teórico e prático adquirido ao longo do curso, mais especificamente em disciplinas como Bromatologia, Hidrologia, Microbiologia e de uma forma geral as químicas, forneceram bases fortes e suficientes para uma rápida adaptação ao laboratório e para o desempenho das diversas atividades neste executadas. Deste modo, não foi necessária uma aprendizagem de raiz, mas sim uma consolidação e amplificação dos conhecimentos base, o que conseqüentemente facilitou a integração, a conquista de um estado de trabalho independente, e motivou um sentimento de segurança e confiança na concretização das múltiplas tarefas propostas.

## **9. Extensão do estágio**

A durabilidade do estágio foi adequada para uma aprendizagem consistente e vasta na área do CQ. O estágio compreendeu a abordagem de vários procedimentos, testes e ensaios indispensáveis ao CQ de cosméticos. Não obstante destes, foi ainda possível a execução de PT em produtos de diferentes naturezas e de ensaios inerentes à estabilidade de dispositivos médicos. Em suma, foi possível ganhar destreza, autonomia e desenvolver conhecimentos e competências em diversas áreas sob as quais um futuro farmacêutico pode vir a desempenhar a sua atividade.

## **Pontos Fracos (*Weaknesses*)**

### **1. Falta de contacto com a área regulamentar**

O foco do estágio na área do CQ, que por um lado é benéfico pois adquirimos um conhecimento aprofundado nesta, por outro pode ser um fator limitante pois não permite o contacto direto com outras áreas, incluindo a área regulamentar dos cosméticos. Esta última, é uma área em crescimento, a qual gostaria de compreender melhor, pois são aqui realizadas, várias etapas de análise, verificando o cumprimento das especificações de eficácia e segurança, com o objetivo de permitir a colocação de um cosmético no mercado.

### **2. Indefinição sobre métodos protocolares**

A tentativa de inovar constantemente e a procura de um mercado mais alargado, apesar de ser muito vantajoso para a empresa, por vezes pode constituir um revés. Em alguns casos, nomeadamente no uso simulado de produtos, a inexistência de protocolos/procedimentos fixos, elaborados anteriormente, levavam à necessidade de pesquisa dos mesmos e/ou à sua constante adaptação por via da tentativa-erro, visto que nem todos os protocolos eram exequíveis, ou havia reprodutibilidade entre resultados. Este facto, para além de causar um grande dispêndio de tempo, atrasava a execução de outras tarefas pendentes.

## **Oportunidades (*Opportunities*)**

### **1. Testes de *performance***

Os PT, contemplam um conjunto de ensaios e procedimentos que têm por objetivo analisar as características e a qualidade de um produto no desempenho de uma função específica. Frequentemente, este teste é utilizado como estudo de mercado para verificar o posicionamento de uma marca no mercado nacional/global, através da sua comparação com produtos concorrentes, pertencentes à mesma categoria, que já se encontrem disponíveis no mercado. Outra das finalidades possíveis para este teste é a análise de várias propostas enviadas por um fabricante, ou retalhista, de modo a perceber qual das propostas mostra um melhor desempenho, e em que parâmetros se distingue das restantes propostas e marcas concorrentes.

São então examinados vários parâmetros de acordo com a finalidade e características dos produtos em causa. Um dos parâmetros a reter são as características FQ, juntamente com as CO, estas últimas, caso apresentem relevância para o produto, o que acontece com frequência. Certos produtos requerem a realização de ensaios específicos de acordo com a sua formulação, como é o caso da determinação de tensioativos aniónicos, teor em cloretos,

teor em cloro ativo e teor em oxigénio ativo por exemplo. Por fim, é imprescindível efetuar uma avaliação em uso simulado dos diferentes produtos, sendo que a forma de avaliação, depende estritamente da finalidade do produto.

Com a execução destes testes, em que existe uma adaptação para cada classe de produtos, existiu a possibilidade de experienciar a forma de como é elaborado o controlo e a análise de certos produtos, que até então era desconhecida, pois não integra normalmente o léxico de um farmacêutico, e da mesma forma permitiu a execução de novos ensaios colocando em prática conhecimentos base.

## **2. Pesquisa e aperfeiçoamento de procedimentos**

Sendo esta uma empresa jovem e dinâmica, em que surgem diariamente novos produtos e consequentemente novos desafios, existem certas áreas por explorar e por aperfeiçoar. Este ponto é dirigido especificamente para os testes de performance, nomeadamente no parâmetro do uso simulado dos produtos, no qual é necessária a pesquisa e adaptação, se for o caso, de protocolos ou procedimentos que sejam reconhecidos por outras organizações, de modo a avaliar corretamente determinada categoria de produtos. Foi com grande oportunidade que tive a oportunidade de participar neste pequeno desenvolvimento da empresa.

## **3. Controlo de água purificada**

Um dos aspetos relevantes na formulação de cosméticos é a qualidade da água utilizada na sua produção. Para evidenciar a qualidade da água purificada, são realizados vários ensaios à mesma, de acordo com métodos farmacopeicos. Este controlo é efetuado recorrendo a ensaios microbiológicos, determinação da condutividade, presença de metais pesados, entre outros ensaios, que no seu conjunto determinam se a água possui os padrões necessários para ser utilizada e garantir uma formulação de sucesso.

## **4. Estudos de estabilidade acelerada de dispositivos médicos**

Para além do que foi abordado durante o MICF, mais propriamente acerca dos ensaios de estabilidade a medicamentos, neste estágio surgiu um momento oportuno de contactar com os EE a que estão sujeitos os dispositivos médicos. O ensaio de estabilidade acelerada consiste na avaliação de vários parâmetros do produto antes de ser colocado em estabilidade e 6 meses após ser mantido a uma temperatura de 40°C. O objetivo deste ensaio é determinar o PAO, o DMD e as suas condições de armazenamento.

## **5. Utilização vigorosa da Farmacopeia Portuguesa**

Os múltiplos ensaios realizados durante o estágio, estão maioritariamente descritos na Farmacopeia Portuguesa, permitindo assim uma fácil interpretação e condução dos ensaios. Esta base literária foi também utilizada profundamente para a pesquisa de procedimentos a aplicar na produção de reagentes necessários à realização de ensaios, o que me permitiu aprofundar o método de pesquisa recorrendo a esta fonte e familiarizando-me com a mesma. Como todo o seu conteúdo está validado, não existe o risco de os métodos/procedimentos utilizados não serem aceites, e deste modo realizamos as tarefas da forma mais correta e rigorosa possível, com a vantagem de obter resultados fidedignos e reprodutibilidade entre ensaios.

## **6. Gestão e realização de tarefas de forma autónoma**

A obtenção de um maior entrosamento com os ensaios e procedimentos efetuados no laboratório, permitiu-me gerir e realizar tarefas de forma independente, acatando maiores responsabilidades. Esta autonomia funcionou como um potenciador, que ajudou a melhorar a minha organização, gestão de tempo e concentração, pois era necessário apresentar as tarefas das quais estava incumbido, com qualidade e num prazo limite. Desta forma, apesar da responsabilidade, senti-me mais confiante e motivado no desempenho do trabalho, o que trouxe vantagens para a própria função, auxiliando no desenvolvimento das minhas capacidades.

## **Ameaças (Threats)**

### **1. Subcontratação de laboratórios para realização de ensaios**

No caso de existirem certos ensaios que não se consigam realizar por falta de equipamento, ou caso os resultados obtidos no mesmo não se mostrem conformes, recorre-se a outro laboratório mais específico para efetuar esse ensaio. Este acontecimento por vezes traduz-se num atraso na execução de relatórios ou de outras atividades que dependam dos resultados desse mesmo ensaio, dificultando a gestão de tarefas e tempo.

## **2. Concorrência pela área laboratorial**

As tarefas envolvidas no CQ não são específicas de um farmacêutico. Assim sendo, qualquer profissional que tenha competências na área laboratorial pode executar as mesmas, apesar da sua prática e capacidade de adaptação se encontrarem possivelmente em diferentes níveis. Este facto, constitui uma ameaça para o futuro desempenho desta atividade por farmacêuticos, dificultando o seu envolvimento neste ramo da indústria e noutros que possuam a mesma atividade.

## **3. Abordagem da área no MICF**

O MICF possui um programa muito completo que possibilita o ganho de competências sob diversos campos, contudo, no que toca a certas áreas, mais propriamente no âmbito dos cosméticos, não existem grandes desenvolvimentos e elucidações que integrem o conteúdo programático do curso. Deste modo apesar de termos uma boa capacidade de adaptação e de compreender os procedimentos e ensaios que se realizam no CQ, não temos qualquer experiência ou conhecimento anterior dos mesmos. Pessoalmente, dada a relevância e crescimento da área, penso que a sua abordagem deveria existir, não só a nível do CQ, como também da área regulamentar, o que facilitaria uma maior integração na indústria cosmética ou noutras similares.

## **Considerações Finais**

A realização do presente estágio na PHL, surpreendeu-me bastante pela positiva, pois tive a felicidade de ser orientado por uma equipa profissional, dinâmica e dedicada, que me auxiliou em vários aspetos e possibilitou uma forma de aprendizagem consistente e contínua. Deste modo, alarguei de forma profunda os meus conhecimentos sobre a área dos cosméticos, com compreensão de muitos dos processos envolvidos no CQ deste tipo de produtos. A execução de ensaios como o CT, os EE, e os EM fizeram-me perceber a dimensão de procedimentos e ensaios, que são imprescindíveis ao CQ desta classe de produtos.

A diversificação de tarefas e ensaios, foi um dos fatores que permitiu uma aprendizagem completa e também ela diversificada. O contacto com produtos de diferentes categorias nos PT e conseqüente execução de diferentes ensaios e procedimentos de análise, levaram a minha compreensão sobre outras indústrias a novos extremos. A abordagem a ensaios relativos a dispositivos médicos, acabou também por expandir os novos limites do meu conhecimento.

Uma das perceções que obtive ao longo do período de estágio, foi o enquadramento do MICF numa prática profissional. Todo o conhecimento teórico e prático desenvolvido ao longo do curso, permitiu de forma facilitada colocar em prática muitas das tarefas às quais estava responsável durante o estágio, o que me possibilita afirmar que o MICF prepara os seus alunos de forma brilhante.

Concluindo, esta nova experiência possibilitou o meu crescimento técnico-científico e social, tornando-me um melhor e mais competente profissional de saúde, e permitiu-me adquirir conhecimentos muito úteis que se podem transpor e aprofundar num futuro próximo.

## Referências Bibliográficas

- [1] Instituto Pedro Nunes - [Acedido a 21 de agosto de 2017] Disponível na Internet: <https://www.ipn.pt/incubadora>
- [2] Pharmilab - [Acedido a 21 de agosto de 2017] Disponível na Internet: <https://www.pharmilab.eu/cosmetics>
- [3] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos** 1ª Edição, Anvisa, Brasília, 2004, ISBN 85-88233-15-0

## Anexos



Figura 1 – Liberação de  $O_2$  por uma amostra colocada a  $40^\circ C$ .

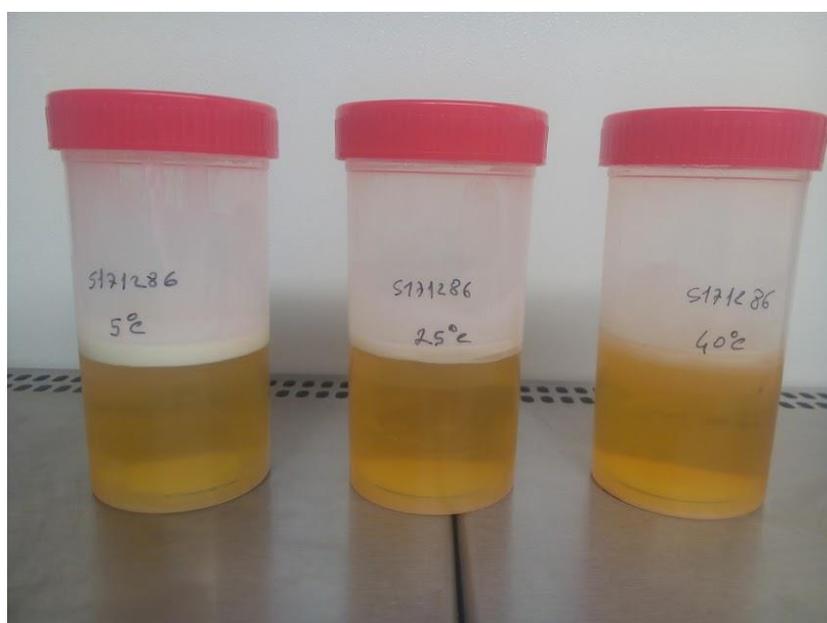
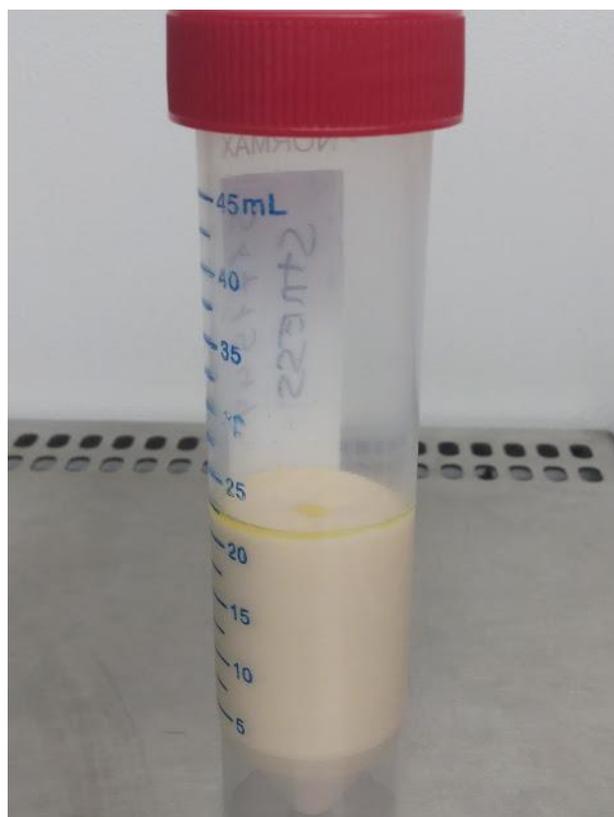
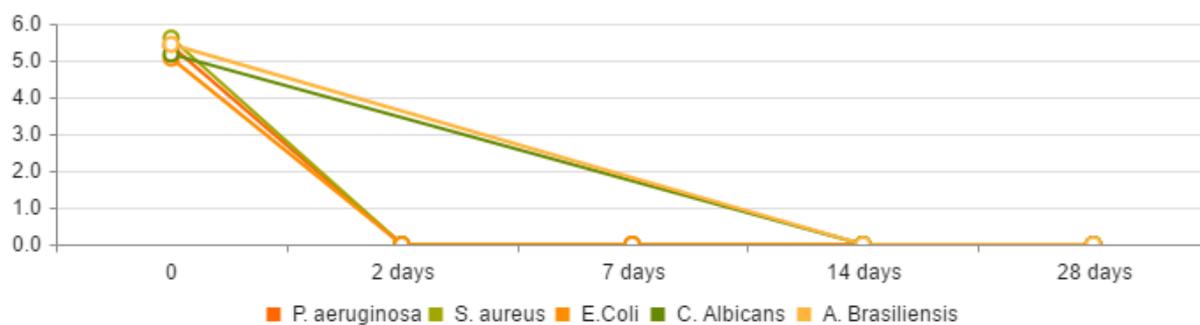


Figura 2 – Separação de fases do mesmo produto a diferentes temperaturas.



**Figura 3** – Separação de fases num produto submetido ao teste de stresse.



**Figura 4** – Gráfico da redução logarítmica da concentração de colónias cfu/g de amostra vs tempo, de uma amostra submetida ao CT.

## Parte III

Dissertação: Exposição ambiental, ocupacional e alimentar a produtos fitofarmacêuticos, e suas consequências no desenvolvimento e prevalência de doenças neurodegenerativas

## Resumo

O risco associado à exposição do Homem a produtos fitofarmacêuticos (PF), nomeadamente através das vias alimentar, ocupacional e ambiental é incontestável. Os compostos ativos presentes neste tipo de formulações visam manter a integridade das plantas, oferecendo um serviço de proteção ou prevenção contra determinados organismos passíveis de afetar as culturas. Devido às suas propriedades físico-químicas a(s) substância(s) ativa(s) presente(s), são facilmente acumuláveis no ambiente, causando um elevado impacto neste e, por extensão, na saúde humana. A bioacumulação deve-se fundamentalmente às propriedades lipofílicas, tempo de semi-vida, capacidade de adsorção e elevada estabilidade destes compostos, determinando que alguns deles, resultem classificados na lista de poluentes orgânicos persistentes (POPs). É com notória facilidade que entram na cadeia alimentar, não só através da sua presença em alimentos, como também pela contaminação de água potável, tornando real o risco de exposição. Esta exposição tem consequências para a saúde humana favorecendo a predisposição para alguns tipos de doenças, em particular as cancerígenas e as neurodegenerativas.

Neste contexto, abordamos neste trabalho alguns grupos de compostos ativos de PF (organofosforados, organoclorados, piretróides, carbamatos, entre outros), expondo as suas relações com a ocorrência da doença de Parkinson e potenciais contribuições para a doença de Alzheimer. Para estas patologias com prevalência crescente a nível mundial, estão identificados diversos fatores etiológicos, nos quais se inclui a exposição a PF. Está comprovado que os fitofármacos, reforçam as características fenotípicas associadas às patologias neurodegenerativas, por exemplo o aparecimento de corpos de Lewy no caso da doença de Parkinson, ou a formação de placas senis amilóides e agregados neurofibrilares na doença de Alzheimer. Para além destes fenómenos, foram já evidenciados os efeitos de compostos ativos de PF na ativação da microglia, na disfunção mitocondrial e do sistema ubiquitina-proteossoma, na desregulação de canais iónicos e de vias de neurotransmissão, na indução de stresse oxidativo e neuro-inflamação. Todos estes efeitos acabam por interferir no processo neurológico, desencadeando um fenómeno de neurodegenerescência.

**Palavras-chave:** Produtos Fitofarmacêuticos, Exposição ocupacional, Exposição alimentar, Exposição ambiental, Neurodegenerescência, Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer.

## **Abstract**

The risk associated with the human exposure to phytopharmaceutical products (PP), particularly through food, occupational and environmental routes is undeniable. The active substances found in these formulations aim to maintain the plants' integrity offering protective or preventive actions against certain organisms capable of affecting crops. Due to their physical and chemical properties, the active substances are easily cumulated in the environment causing a high impact on it and by extension on the human health. The bioaccumulation is fundamentally due to the lipophilic properties, half-life time, adsorption capacity and high stability of these compounds, resulting in the classification of some as persistent organic pollutants (POP's). It's with notorious ease that they enter the food chain, not only through food, but also by potable water contamination making the exposure risk real. This exposure brings consequences to the human health favoring the predisposition to certain diseases like the carcinogenic and neurodegenerative ones.

In this context, some active compounds of the PP (organophosphates, organochlorines, pyrethroids, carbamates, among others) are approached in this work setting out their connections regarding Parkinson's disease occurrence and potential contributions to Alzheimer's disease. For these pathologies with a growing worldwide prevalence, several etiological factors have been identified, including the exposure to PP. It has been proven that phytopharmaceuticals reinforce the phenotypic characteristics associated with neurodegenerative pathologies, for example the appearance of Lewy bodies in Parkinson's disease, or the senile amyloid plaques and neurofibrillary aggregates formation in Alzheimer's disease. Besides these phenomena, the effects of PP active compounds on microglial activation, mitochondrial and ubiquitin-proteasome system dysfunctions, ion channels and neurotransmission pathways deregulation, oxidative stress induction and neuroinflammation have been evidenced. All these effects end up interfering with the neurological process triggering a neurodegenerative phenomenon.

**Keywords:** Phytopharmaceutical products, Occupational exposure, Food exposure, Environmental exposure, Neurodegenerative process, Parkinson's disease, Alzheimer's disease.

## Lista de Abreviaturas

- A $\beta$  – beta-amiloide  
ACh – Acetilcolina  
AChE – Acetilcolinesterase(s)  
AD – Doença de Alzheimer  
ALDH – Aldeído desidrogenase  
APOE - Apolipoproteína E  
APP – Proteína precursora amiloide  
BHE – Barreira hemato-encefálica  
CA – Carbamatos  
CLO – Clorpirifos  
DA – Dopamina  
DAP – Proteína transportadora de dopamina  
DDE – Diclorodifenildicloroetileno  
DDT – Diclorodifeniltricloroetano  
DLD – Dieldrina  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DOPAC – Ácido 3,4-Dihidroxifenilacético  
DOPAL – 3,4-dihidroxifenilacetaldeído  
ES – Tamanho do efeito  
EU – União Europeia  
FEN – Fenpropatrina  
GFAP – Proteína ácida fibrilar glial  
GSH – Glutaciona  
GSSG – Glutaciona dissulfeto  
HR – *Hazard ratio*  
I.P. – Injeção intraperitoneal  
LDN – Lindano  
LMR – Limite máximo de resíduo  
MDA – Malondialdeído  
MMP – Potencial de membrana da mitocôndria  
MMSE – *Mini Mental State Examination*  
MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

OC – Organoclorados  
OF – Organofosforados  
OR – *Odd ratio*  
PD – Doença de Parkinson  
PF – Produtos fitofarmacêuticos  
PIR – Piretróides  
PON I – Paraoxonase I  
POPs – Poluentes Orgânicos Persistentes  
PQ – Paraquato  
PSEN 1 – Presenilina 1  
PSEN 2 – Presenilina 2  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
ROT – Rotenona  
SNC – Sistema nervoso central  
SNpc – *Substantia nigra pars compacta*  
SOD – Superóxido dismutase  
TH – Tirosina Hidroxilase  
TH – Tirosina-hidroxilase  
TNF-  $\alpha$  – Fator de necrose tumoral  $\alpha$   
UPS – Sistema ubiquitina-proteossoma  
VGSC – Canais de sódio dependentes de voltagem  
VMAT – Transportador vesicular de monoaminas  
VMAT2 – Transportador vesicular de monoaminas 2  
ZR – Ziram

## **I. Introdução**

Devido ao acelerado crescimento da população mundial, estima-se que por volta de 2030 esta atinja os 8,5 bilhões de pessoas e que em 2050 estes números se elevem até aos 9,7 bilhões [1], representando assim um incremento de cerca de 1/3 sobre a atual população. Este facto vai trazer muitos desafios e mudanças, tanto económicas como culturais e demográficas, mas um dos principais problemas associados a este crescimento espontâneo da população, é a disponibilidade de alimento.

Algumas projeções apontam que, para satisfazer as necessidades alimentares de uma população de 9,7 bilhões, será necessário aumentar a produção alimentar em cerca de 70% relativamente à atual, sendo que nos países em desenvolvimento a produção terá que duplicar. Por exemplo, a produção de cereais terá que aumentar em cerca de 1 bilhão de toneladas e a produção de carne em cerca de 200 milhões de toneladas, até às necessárias 470 milhões de toneladas em 2050. É então imprescindível expandir os meios e as formas de produção, com vista a aumentar a eficiência e a produtividade [2]. Consequentemente, além de outras intervenções, prevê-se a necessidade crescente do uso de produtos fitofarmacêuticos (PF) [3].

A definição de PF engloba todas as substâncias que visam manter a saúde das plantas bem como prevenir a destruição ou infestação das mesmas. Sendo assim, são produtos muito importantes para a produção de alimento, como testemunha a dimensão do seu consumo (395 768 toneladas de substância ativa de PF, apenas na Europa, em 2014 [4][5]). O uso destas substâncias, apesar de serem objeto de rigoroso controle ao nível da sua eficácia, toxicidade e de possíveis efeitos na saúde animal e ambiente, levanta, contudo, algumas reservas, relativamente às consequências a longo prazo, quer para o ambiente, quer para a saúde humana. Admite-se, por exemplo, a relação entre a exposição a PF e a prevalência de doenças graves, tais como as doenças neurodegenerativas.

Nesta dissertação procuraremos sistematizar a informação científica disponível sobre as possíveis relações entre a exposição a PF e as doenças neurodegenerativas, abordando as possíveis fontes de risco, incluindo a exposição ambiental, ocupacional e alimentar a este tipo de produtos, bem como os mecanismos pelos quais poderão ser modulados os processos de neurodegenerescência. Trata-se de um problema de saúde pública e alimentar que tende a assumir proporções maiores e que justifica preocupação social e prioridade na intervenção científica e regulamentar.

## **2. Produtos Fitofarmacêuticos**

### **2.1 Definição**

Segundo a definição adotada na Diretiva 91/414/CEE [6] , e assim transposta para a legislação nacional [7], os PF, são as substâncias ativas e as preparações que contém uma ou mais substâncias ativas, que sejam apresentadas sob a forma em que são fornecidas ao utilizador e se destinem a: a) proteger os vegetais ou os produtos derivados desses vegetais, de todos os organismos prejudiciais, ou a impedir a sua ação, desde que essas substâncias ou preparações não estejam a seguir definidas de outro modo; b) exercer uma ação sobre os processos vitais dos vegetais (exemplo: os reguladores de crescimento), com exceção das substâncias nutritivas; c) assegurar a conservação dos produtos vegetais, desde que tais substâncias ou preparações, não sejam objeto de disposições comunitárias especiais relativas a conservantes; d) destruir os vegetais indesejáveis; e) reduzir ou impedir o crescimento indesejável dos vegetais ou de alguns órgãos; f) serem utilizados como adjuvantes [4][8][9].

Os PF classificam-se em categorias de acordo com a sua finalidade e alvos: na categoria dos inseticidas incluem-se substâncias ativas que atuam no controle de populações de insetos, como são exemplos os compostos organoclorados (OC) os organofosforados (OF), os piretróides (PIR) ou os carbamatos (CA) com ação letal, ou repelentes, como a citronela e a dietiltoluamida (DEET) [10]. A categoria dos fungicidas inclui compostos ativos sobre fungos fitopatogénicos, tais como os ditiocarbamatos, os tiabendazóis, entre outros, enquanto que, os herbicidas destinados ao controle de infestantes incluem, por exemplo, compostos da família dos bipiridilos ou dos glifosatos [10]. Algumas destas substâncias serão detalhadas nesta dissertação no que respeita às suas relações com as doenças neurodegenerativas.

### **2.2 Breve Contextualização Histórica**

A primeira referência sobre utilização de PF aponta para a utilização por parte dos sumérios, há cerca de 4500 anos, de compostos sulfurados para controlar pestes que ameaçavam as suas culturas. Outras referências referem o uso, pelos chineses, do arsénio e do mercúrio para controlar pragas de piolhos nos seus campos agrícolas [11].

Novas substâncias com ação preventiva ou curativa foram sendo descobertas e utilizadas até à grande expansão que a síntese química trouxe ao desenvolvimento de PF. Zeidler, em 1874, sintetizou o controverso diclorodifeniltricloroetano (DDT) sendo que apenas em 1939, Paul Müller descobriu a sua finalidade como inseticida. No ano de 1940 foi atribuída a patente a este inseticida, a primeira na história dos PF [11][12].

O uso do DDT foi evidenciado durante a II Guerra Mundial, quando esta substância foi dispersa sobre pessoas e objetos com o objetivo de erradicar possíveis vetores de tifo epidémico ou de malária. Para além desta utilização, este composto mostrou-se eficaz contra uma grande diversidade de outros agentes que ameaçavam a agricultura. Atualmente, apesar de ter sido banido pela sua toxicidade e prevalência ambiental, ainda é utilizado em alguns países em desenvolvimento como método de controlo da malária.

Foi também nos meados dos anos quarenta, que surgiram os pesticidas OC. São exemplo disso, o aparecimento do lindano (LDN), do clordano, da aldrina e da dieldrina (DLD), todos potentes inseticidas, que atualmente se encontram banidos. Uma publicação muito importante que levou à tomada deste tipo de medidas foi o livro de Rachel Carson, *Silent Spring*, em que foram abordadas as consequências da acumulação deste tipo de produtos no ambiente, nomeadamente os efeitos que a exposição ao DDT provocava nas aves selvagens [11][13]. Esta publicação abriu caminho para um maior controlo e monitorização deste tipo de substâncias e das suas potenciais consequências, tanto para o Homem como para as outras espécies e ecossistema. Por sua vez, os PIR, potentes pesticidas, surgiram na década de 1970 e ainda hoje são utilizados, representando cerca de 20% do mercado global de venda de inseticidas [13]. Ainda nessa década apareceu o glifosato, um dos mais famosos herbicidas, provocando a diminuição do uso de sulfonilureias e imidazolinas. Mais recentemente, na década de 1990, deu-se entrada a mais uma classe de inseticidas, os neonicotinóides [12].

A tendência que se seguiu, foi a de racionalizar a síntese de pesticidas, com o propósito de obter produtos mais eficazes, mais seletivos e com propriedades que minimizem a bioacumulação, a persistência ambiental e que apresentem segurança, tanto para o ecossistema, como para a saúde do Homem [11].

### **2.3 Bioconcentração e exposição ambiental**

Devido às suas propriedades físico-químicas e modo de aplicação, os PF aplicados em qualquer cultura, acabam por dispersar pelo ambiente, podendo afetar solo, ar e água, e deste modo, acumular na cadeia alimentar, tornando muito mais provável a exposição crónica ou mesmo aguda a este tipo de produtos, por parte do ser humano.

Uma vez aplicados no alvo recorrendo a formulações de aerodispersão ou de granulados, estes produtos acabam por afetar a área circundante ao alvo, desde logo, colocando em risco o aplicador, os organismos presentes no habitat e, até, as próprias plantas da cultura. Para além disso, a contaminação pode ter uma distribuição mais ampla, uma vez que, quer após a dispersão ou ulterior volatilização, poderá ocorrer deposição no solo com consequente contaminação de águas superficiais e lençóis freáticos, comprometendo as reservas de água

potável (Figura 1) [5][8]. Uma vez presentes nas águas de superfície, afetam a vida dos organismos aquáticos (os que evidenciam as maiores concentrações de resíduos), acumulando-se em vários tecidos e entrando assim, na cadeia alimentar [8].

Este conjunto de fenómenos, que contribuem para a dispersão e acumulação ambiental de fitofármacos colocam em causa a saúde humana e animal. A elevada persistência no meio ambiente, depende de características ambientais e das propriedades físico-químicas destas substâncias. A temperatura, a humidade e outras condicionantes influenciam a semi-vida e a taxa de deposição dos produtos, enquanto que o coeficiente de partilha determina a maior ou menor dispersão em meio aquático e a sua persistência ambiental [5][10]. Para efeito de maior controlo destes compostos, foi criada uma lista de Poluentes Orgânicos Persistentes (POPs), na qual são nomeadas substâncias que permanecem intactas no ambiente durante muitos anos e que têm capacidade para se acumular e biomagnificar, encontrando-se em elevadas concentrações na cadeia alimentar, produzindo efeitos tóxicos. Esta lista criada de acordo com a convenção de Estocolmo [14], conduziu a que o uso de substâncias que nela constam, tais como a aldrina, o DLD, o DDT e o clordano, fossem banidas [10].

#### **2.4 Regulamentação de Produtos de Proteção de Plantas**

A existência de regulamentação própria, no que respeita à produção, venda e distribuição destes produtos, para além de cuidados específicos na sua utilização e na monitorização de resíduos, tem vindo a ser considerada, dadas as consequências de uma produção e uso desregulados. A atual regulamentação para introdução no mercado de PF é já bastante exigente, próxima do nível respeitante à introdução no mercado de novos medicamentos. Para além disso, outros aspetos regulamentares de grande relevância dizem respeito aos limites toleráveis para os resíduos de PF em plantas e alimentos de consumo humano e animal, mas também em recursos hídricos.

A(s) substância(s) ativa(s), que compõem os produtos de proteção de plantas, têm de ser sujeitas a uma avaliação prévia à sua aceitação no mercado. Para tal, na União Europeia (EU), a autoridade de segurança alimentar (*European Food Safety Agency – EFSA*) aprecia o dossier, submetido pela entidade proponente do produto, e elabora um relatório (*Assessment report*) que inclui a avaliação do seu impacto na cadeia alimentar e na saúde animal, para ulterior apreciação e votação (entre os estados membros da EU) sobre a aprovação da substância ativa. Após estas etapas e caso haja aprovação, a substância é adotada pela Comissão Europeia para efeitos de autorização para comercialização e uso (publicada no Jornal Oficial da EU). Após conclusão do procedimento, as substâncias aprovadas são registradas numa base de dados de seu nome *EU Pesticides database* [15].

Para além das condições impostas pela EU para aprovação de uso das substâncias ativas, a autorização de venda de um PF, implica ainda a apreciação de um dossier técnico do produto em análise, que inclui, várias informações acerca do produto, como por exemplo a avaliação físico-química, provas de eficácia e segurança, toxicologia, avaliação de riscos, intervalo de segurança e limite máximo de resíduo (LMR) [8]. Essa avaliação corre sob a égide da Comissão Europeia, através de um sistema de avaliação centralizado, o *Protection Products Application Management System* e sob a égide das autoridades nacionais do Estados Membros onde o produto será comercializado [16].

Outras instâncias reguladoras estipulam limites para resíduos de PF, tais como os toleráveis em recursos hídricos. A *Drinking Water Directive* [17] estabelece o valor máximo de 0,1 µg/litro para o resíduo de uma substância ativa única e seus metabolitos relevantes, e de 0,5 µg/litro para o total dos resíduos de substâncias ativas detetadas. Estes limiares, garantem assim a qualidade dos recursos hídricos, nomeadamente da água potável [4][8].

### **3. Neurodegenerescência – Evidências de risco**

Estima-se que a nível mundial, cerca de 1 bilião de pessoas são afetadas por doenças neurodegenerativas. Este número tem tendência para aumentar, pois são doenças que dependem do fator idade, e tanto a esperança média de vida, como a qualidade dos cuidados de saúde têm vindo a sofrer um incremento nestas últimas décadas [18].

Estas patologias, para além de se relacionarem com o processo de envelhecimento, têm, na sua génese, outros fatores de risco, endógenos e exógenos, como os fatores genéticos e ambientais, além de outros relacionados com os hábitos pessoais, tais como a dieta ou o tabagismo. Dos fatores ambientais, sublinha-se, entre outros, a exposição a metais, solventes ou a exposição prolongada e a baixas dosagens de fitofármacos, através do consumo de alimentos que bioacumulam estas substâncias. Apesar de tudo, este risco difere de pessoa para pessoa, e num cenário de exposição ocupacional, às quais agricultores e outros operadores agrícolas estão sujeitos, há que ter em conta o risco de exposição aguda e crónica, sobretudo por via dérmica e inalatória [19].

Os fitofármacos podem despoletar processos neurodegenerativos, pois muitas destas substâncias ativas possuem propriedades físico-químicas que lhes conferem não só a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), como também, a de induzir perturbações celulares e metabólicas [20][21].

Com base nestes factos, é necessário obter evidências que permitam perceber e denunciar o risco associado à sua exposição e as suscetibilidades provocadas por este tipo de substâncias,

recorrendo à elucidação de mecanismos envolvidos, particularmente, no desenvolvimento de distúrbios no sistema nervoso central (SNC), nomeadamente na doença de Parkinson [22].

### **3.1 A doença de Parkinson como consequência da exposição a fitofármacos**

A PD é uma das doenças com maior prevalência relacionada com a idade. Tem uma incidência elevada em países desenvolvidos, nos quais mais de 1% da população com mais de 60 anos sofre desta doença [19][23]. Em 2005 foi estimada a existência de cerca de 4,4 milhões de pessoas afetadas por esta doença, valores que se esperam duplicar até ao ano de 2030, devido, fundamentalmente, à taxa de crescimento populacional e ao resultante aumento da faixa etária da população considerada idosa.

Esta é uma patologia progressiva que afeta o movimento, caracterizada por certos sintomas como a bradicinésia, rigidez muscular, tremores e instabilidade postural, sendo uma das maiores causas de morbidade nos idosos. A maioria dos casos reportados são considerados idiopáticos, acreditando-se assim, que o desenvolvimento da doença resulte da acumulação e combinação de diferentes fatores ambientais, mas também de interações gene-ambiente que surgem ao longo do processo de envelhecimento [18].

Sendo assim, é uma doença à qual estão associados vários fatores despoletantes da mesma, como os fatores ambientais que incluem a exposição a pesticidas, fatores genéticos, fatores geográficos e mesmo o próprio sexo, sendo uma patologia mais prevalente nos homens [23].

Esta doença está associada à perda progressiva de neurónios dopaminérgicos na *substantia nigra pars compacta* (SNpc), resultando numa disfunção dos gânglios basais responsáveis por controlar os movimentos voluntários [23]. Os sintomas motores inerentes à doença têm início após a perda de cerca de 70% dos níveis de dopamina (DA) do corpo estriado e de 50% de neurónios dopaminérgicos na via nigro-estriada. Apesar disso, existem outras manifestações que precedem o início dos sintomas motores, como a disosmia, obstipação e hipotensão ortostática, suportadas pela presença de inclusões intraneuronais (intracitoplasmáticas) compostas principalmente por agregados de  $\alpha$ -sinucleína (corpos de Lewy), característicos da doença, em vários sistemas neuronais para além da via nigro-estriada, desde o bulbo olfatório, nervos simpáticos cardíacos, sistema nervoso entérico ao sistema nervoso periférico [18][24].

Um dos fatores mais relevantes no desenvolvimento desta condição é de natureza genética. Esta forma de parkinsonismo tem o seu início desde muito cedo (antes dos 40 anos) e foram descritos alguns genes responsáveis pelo desenvolvimento e aparecimento de sintomas relacionados com a doença. Esses genes, que exercem os seus efeitos diretamente nos neurónios dopaminérgicos, estão situados no *loci* PARK e incluem o gene da  $\alpha$ -sinucleína, e os genes que expressam as proteínas *Leucine-Rich repeat kinase 2* (LRRK2), *PTEN-induced putative*

*kinase 1*, DJ-1 e ATP13A2 por exemplo [18]. Os polimorfismos genéticos que ocorrem em sequências de genes que controlam determinados processos como o metabolismo de xenobióticos, o seu transporte, disfunção mitocondrial, stresse oxidativo, e toxicidade neuronal também contribuem para o aparecimento desta doença. Alguns genes envolvidos são:

- O gene da CYP2D6, enzima pertencente à família do citocromo P450, responsável pela metabolização de compostos OF, CA (maneb e ziram (ZR)) e 1-metil-4-fenil-1,2,3,6,tetrahidropiridina (MPTP) e o gene da PON 1, uma esterase que catalisa a hidrólise de metabolitos ativos (oxões) de alguns OF como o paratião e o CLO.

- O gene ABCB1 que codifica uma proteína transmembranar denominada de MDR1 – *multidrug resistance protein 1*, funcionando como uma bomba de efluxo ATP dependente, que remove uma grande quantidade de substâncias endógenas, substâncias ativas e xenobióticos, prevenindo a sua acumulação no cérebro.

- Os genes da glutathione S-transferase, uma família de enzimas citosólicas que catalisam a conjugação da glutathione (GSH) que se encontra na forma reduzida com as espécies reativas provenientes dos xenobióticos, de substratos tóxicos endógenos ou de espécies reativas que se formam nos processos de stresse oxidativo.

- O gene do transportador de dopamina (SLC6A3), expressa a proteína transportadora de dopamina (DAP), que realiza o *reuptake* do neurotransmissor em causa, da fenda sináptica para os terminais pré-sinápticos, onde se inicia a transmissão dopaminérgica [25].

A exposição ambiental a substâncias químicas, especialmente a fitofármacos e as condições que a favorecem, tais como a exposição profissional (sector agrícola), habitar em meio rural ou mesmo a utilização de poços como fonte de água para consumo, representam potenciais riscos no aparecimento de Parkinson.

Este risco é fomentado por certos fitofármacos serem reconhecidos como neurotóxicos e estimularem fenómenos de degeneração dopaminérgica. Esta relação teve a sua descoberta na década de 1980 em que se descobriu que a toxina MPTP, provocava Parkinsonismo crónico e degeneração dopaminérgica em humanos. Este composto é estruturalmente similar ao herbicida paraquato (PQ), o que fez com que a partir desse momento se pusesse em causa os potenciais riscos neurotóxicos que muitos dos pesticidas apresentavam e qual a relação entre a sua exposição e as doenças neurodegenerativas, nomeadamente o Parkinson [26]. Os mecanismos implicados na exposição a produtos protetores de plantas na promoção desta doença incluem stresse oxidativo, disfunção mitocondrial, neuro-inflamação e comprometimento do sistema ubiquitina-proteossoma (UPS) [24].

Para melhor compreender as causas pelas quais os PF estão interligados ao aparecimento e desenvolvimento da PD, e precedentemente à abordagem de diversos compostos relacionados com esta doença, é necessário analisar a transmissão dopaminérgica.

### **3.1.1 Transmissão dopaminérgica**

A transmissão dopaminérgica está implicada em diversos processos comportamentais, como a função psicomotora, memória, motivação, ganho de vícios e sensação de recompensa. A DA é o neurotransmissor em causa, e é sintetizado em meio intracelular através da conversão da tirosina em L-DOPA, precursor da DA, por ação enzimática da tirosina-hidroxilase, sendo então convertida a DA pela descarboxilase de L-aminoácidos aromáticos. Após a sua síntese, este neurotransmissor é armazenado em vesículas com a ajuda de um transportador vesicular de monoaminas (VMAT), por transporte ativo. Após a fusão desta vesícula com a membrana plasmática dos neurónios, o neurotransmissor é libertado para a fenda sináptica, encontrando-se livre para se ligar aos recetores dopaminérgicos, nomeadamente os D1 e D2 [19].

Estes recetores, acoplados à proteína G, quando ativados desencadeiam diferentes respostas. Os recetores D1 regulam os canais de cálcio dependentes de voltagem e os canais de potássio, já os recetores D2 têm um efeito inibitório nos canais de cálcio dependentes de voltagem e reduzem a neurotransmissão dopaminérgica [19].

A DA extracelular pode ser reciclada novamente da fenda sináptica para as terminações pré-sinápticas, através do DAT, local no qual pode ser armazenada de seguida em vesículas, ou degradada pela monoamina oxidase (MAO). Outro processo que se pode verificar é a sua metabolização pela catecol-o-aminotransferase (COMT) ainda na fenda sináptica [19].

### **3.1.2 Consequências moleculares e celulares da exposição a Piretróides**

Esta classe de PF, deriva de piretrinas naturais isoladas de plantas do género *Chrysanthemum*. Os PIR podem ser divididos em dois grupos, baseados na sua estrutura e nos efeitos neurotóxicos que provocam. São eles:

- Tipo I ou síndrome T (tremores) – a este tipo pertencem compostos como a permetrina, aletrina e cimetrina, sendo desprovidas do grupo alfa-ciano na extremidade fenoibenzílica. Existem alguns sintomas subjacentes a este síndrome como é o caso do desenvolvimento de comportamento agressivo, tremor fino que progride para corpo inteiro e prostração.

- Tipo II ou síndrome CS (coreoatetose) – pertencem a este tipo, compostos como a cipermetrina e a deltametrina que, possuem uma extremidade alfa-ciano e provocam salivação profusa, coreoatetose, hipersensibilidade e convulsões clónicas [18].

As diferenças registadas entre estes grupos de PIR, foram descobertas após a execução de testes em ratos por administração oral ou intravenosa da mesma classe de fitofármacos. Apesar disso, a correspondência entre a estrutura e os diferentes sintomas não é perfeita, pois existem certos compostos com uma estrutura do tipo II capazes de desencadear ambos os sintomas (CS e T) ou somente os do tipo T [13].

Esta classe de produtos de grande utilização a nível global, apresenta baixa toxicidade em mamíferos, sendo o isómero *cis*, habitualmente o mais tóxico [13]. O mecanismo pelo qual este tipo de compostos representa um risco para a saúde é o mesmo pelo qual exerce o seu efeito inseticida, ou seja, pelos efeitos sobre os canais de sódio dependentes de voltagem (VGSC). Os canais de sódio acima referenciados são constituídos por uma subunidade  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ [13]. Os PIR ligam-se então à subunidade  $\alpha$  e retardam a abertura dos canais de sódio, bem como o seu fecho. Deste modo, os canais de sódio abrem a potenciais mais hiperpolarizados que o normal, e permitem uma maior entrada dos respetivos iões que despolarizam e mantêm a membrana dos neurónios despolarizada. Enquanto os do tipo I mantêm os canais abertos o tempo suficiente para causar despolarizações repetitivas, os do tipo II, como mantêm os canais abertos durante mais tempo em comparação com o tipo I, conduzem a célula nervosa a um tal estado de despolarização, que não permite a geração de um novo potencial de ação [13][18].

Para além da ação anterior, os PIR do tipo II desempenham um papel relevante nos canais de cloro e de cálcio. Estes inibem os canais de cloro associados à transmissão GABAérgica, contribuindo para os sintomas relacionados com a intoxicação por parte destas substâncias. Quanto ao seu papel nos canais de cálcio, ainda se apresenta inconclusiva a capacidade de inibição ou estimulação destes canais. Ainda assim, parecem estar associados com o aumento da libertação de neurotransmissores cálcio-dependentes [13].

Os principais problemas relacionados com a exposição a PIR, são a sua neurotoxicidade, incluindo a neurodegeneração dopaminérgica que pôde ser evidenciada em alguns estudos. A permetrina em concentrações baixas (0,8–1,5 mg/kg) administrada a ratos C57Bl/6 levou, tanto ao aumento do *uptake* de DA em 33%, como também dos níveis de DAT, 28 dias após o tratamento. Outros estudos revelam que apesar de uma exposição de 3 meses a esta substância, não foi alterada a expressão de tirosina hidroxilase (TH) nem de DAT nos

terminais dopaminérgicos do estriado. Esse facto já não se verifica após uma exposição de 6 meses para a expressão de TH, que se passa a encontrar sobre-expressa [18].

Um dos PIR do tipo II, a deltametrina, possui a capacidade de induzir apoptose de neurónios corticais em cultura. Num dos testes realizados, este composto aumenta os níveis de ácido *3,4-dihidroxifenilacético* (DOPAC) sem alterar os de DA, quando submetidos a doses não tóxicas do mesmo. Num outro procedimento, a exposição a deltametrina num período pós-natal em ratos e algum tempo após a primeira exposição com a mesma dose, resultou no aumento dos níveis de um biomarcador de deterioração cerebral, hipertrofia e redução de dendrites [18].

Além disso, a exposição por via dérmica, através da contaminação da pele, simulando um caso de exposição ocupacional prolongada durante 4 semanas (30 mg/kg/dia), foi acompanhada por indícios de lesão cerebrocortical e perda de DA e do seu transportador no hipocampo e no estriado [18].

Um dos estudos com fundamentação sobre a cipermetrina aponta para o início de sinais de neurodegeneração após uma exposição prolongada (12 meses) em ratos adultos. Também, que uma exposição pós-natal pode desencadear uma maior suscetibilidade à substância em causa, após nova exposição na idade adulta. Este composto está associado a uma redução dos níveis de DA, distúrbios na atividade motora e ativação da microglia [18].

A ativação da microglia é um processo que revela extrema importância no processo neurodegenerativo que pode ser iniciado, não somente por este grupo de compostos, mas também por outros. Os PIR estão envolvidos na ativação da microglia merecendo, por isso, destaque, pelas consequências que este processo traz às células nervosas.

As células da microglia são células que pertencem ao sistema imunitário e estão presentes no SNC, apresentando como função intrínseca a reparação de neurónios, atuando também como células neuroprotectoras. Quando ativadas persistentemente, estas células têm a tendência de produzir e libertar espécies reativas de oxigénio (ROS) e citocinas inflamatórias, tal como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). A libertação destas substâncias conduz ao aparecimento e manutenção de um fenómeno neuroinflamatório que poderá conduzir à morte neuronal e suscitar um processo de neurodegeneração, contribuindo desta forma para o aparecimento de doenças como o Parkinson e o Alzheimer [27].

Existem várias vias que regulam a ativação da microglia e decorrente libertação de citocinas. Uma das alternativas em causa, refere-se ao papel que os iões de sódio podem desempenhar neste processo, estando estes iões interligados aos VGSC que também podem ser encontrados em células não neuronais. Estes canais estão envolvidos em vários processos celulares como a migração, proliferação, fagocitose e mesmo a alteração da morfologia da

célula. Como os PIR têm a capacidade de ultrapassar a BHE e ativar os VGSC, estipulou-se a hipótese de os mesmos provocarem um influxo de iões de sódio por estes canais e respetiva acumulação intracelular, desencadeando a ativação da microglia e, conseqüentemente, dar início ao processo inflamatório mediado pelo TNF- $\alpha$ , que por sua vez poderá induzir a via apoptótica. Deste modo, este efeito foi estudado para a deltametrina e a permetrina [27]. O estudo baseou-se no tratamento de células BV2 e de células primárias da microglia, sujeitas a diferentes doses de deltametrina e permetrina, durante 24 e 48 horas na presença ou ausência de tetradotoxina, um bloqueador dos VGSC. Demonstrou-se que, mesmo em baixas concentrações, os compostos em causa levaram a um rápido influxo de Na<sup>+</sup> pelos VGSC, pois estes permaneceram abertos durante um período mais prolongado, culminando num excesso deste ião no meio intracelular e uma subsequente ativação da microglia, verificando-se um aumento da libertação de TNF- $\alpha$ . A ativação destas células do sistema imunitário foi acompanhada por uma alteração morfológica, pois tornaram-se maiores e de forma ameboide. Devido às diferenças estruturais entre os PIR, a deltametrina revelou-se capaz de levar a uma maior acumulação de Na<sup>+</sup> intracelular em comparação com a permetrina, pois a primeira consegue manter os VGSC abertos durante um maior período. Relativamente à produção e libertação de TNF- $\alpha$ , ambas mostraram capacidade de aumentar estes processos [27].

Quanto à tetradotoxina, esta revelou-se eficaz em limitar o aumento intracelular do ião sódio, mas não foi capaz de eliminar a produção de TNF- $\alpha$ , dando a perceber a possibilidade de existência de outros mecanismos envolvidos na sua libertação. Uma das possibilidades tem em conta a abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, pois existem certos PIR capazes de produzir este efeito, como é o caso da deltametrina que estimula o influxo de cálcio, o que poderá resultar na libertação de TNF- $\alpha$  por vias alternativas [27].

Apesar de serem necessários mais estudos nesta área para perceber ao certo o modo como os canais em causa contribuem para a neurodegenerescência, tendo em conta a possibilidade de existirem vias alternativas para os efeitos dos PIR, demonstrou-se que este tipo de fitofármacos, através da ativação dos VGSC presentes na microglia, leva ao aumento da produção e libertação de TNF- $\alpha$ , iniciando um estado de neuroinflamação que, ao ser mantido, provoca um fenómeno de neurodegenerescência. Estes dados são suportados pelo facto de muitos doentes diagnosticados com Parkinson e Alzheimer possuírem elevadas concentrações desta citocina [19].

### 3.1.2.1 Fenpropatrina

A fenpropatrina (FEN) é um piretróide utilizado como inseticida, que contém na sua estrutura uma extremidade alfa-ciano, embora desencadeie sintomas neurotóxicos de ambos

os grupos desta classe de fitofármacos. Este composto é rapidamente metabolizado e eliminado, e dadas as suas características físico-químicas possui uma semi-vida longa em meio aquoso, apresentando-se como uma fonte de toxicidade para os peixes. Relativamente à sua toxicidade em humanos, existem relatos de que, após consumo de peixes envenenados por este composto, desenvolveram-se sintomas, tal como tremores, que conduziram a um diagnóstico final da PD. Estudos em ratos, revelaram uma diminuição da concentração de ácido quinurénico, um catabolito do triptofano e antagonista do glutamato, após exposição à fenpropatrina e à deltametrina. Em doentes com Parkinson, a concentração de ácido quinurénico no tecido cerebral e no líquido cefalorraquidiano, está igualmente diminuída.

Outro estudo [28], conduzido com modelos celulares SH-SY5Y e com ratos adultos Sprague-Dawley investigou a possível correlação entre este inseticida e o desenvolvimento da PD. Para o estudo *in vivo* recorreu-se à administração de FEN por injeção intraperitoneal (I.P.) e por injeção estereotáxica. Os grupos de controlo receberam óleo de milho pelas mesmas vias.

Nos estudos com células evidenciou-se que a FEN afetava a viabilidade, inibindo a proliferação celular, de forma dependente da dose e do tempo. Em toda a gama de dosagens, de 1 a 100  $\mu\text{M}$ , foi possível observar a inibição da viabilidade celular. Para além disso, esta substância mostrou-se capaz de alterar a morfologia das células, de elevar a taxa de apoptose, de diminuir o potencial de membrana e de aumentar a concentração de ROS. Foram ainda encontradas inclusões citoplasmáticas similares a corpos de Lewy nas células expostas a este inseticida durante 48h (doses de 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ ). Ao proceder a uma administração de anticorpos para a  $\alpha$ -sinucleína, ubiquitina e P62, obteve-se uma reação imunitária positiva, ou seja, foi confirmada a presença de agregados destas proteínas, o que mais uma vez indica a presença de corpos de Lewy, cujo aparecimento é comum em doentes diagnosticados com Parkinson.

Quanto aos testes *in vivo*, foi comprovada a facilidade deste composto em ultrapassar a BHE, pois foi detetada FEN no tecido cerebral de ratos em que a administração foi realizada por injeção intraperitoneal. Como um dos objetivos do estudo consistia em elucidar os potenciais efeitos deste PIR na substância nigro-estriada, recorreu-se a infusões estereotáxicas da mesma, diretamente na SNpc e na área tegmental ventral dos ratos. Foram então avaliados os efeitos deste composto ao fim de 60 e 120 dias, após a I.P. A exposição à FEN conduziu a alterações de alguns órgãos periféricos 60 dias após a exposição, sendo que o comportamento motor não foi afetado. Apesar disso, 120 dias após a exposição, os animais demonstraram uma redução do comportamento exploratório, o que indica que os sintomas causados por esta substância ativa são progressivos e não agudos.

Quanto às repercussões a nível neuronal, observou-se a perda de neurónios TH-positivos e a diminuição da expressão de TH na SNpc e estriado, em ambos os grupos teste. Os níveis de DA também sofreram os mesmos efeitos, pois encontraram-se reduzidos, concluindo-se, assim, que este composto consegue afetar os neurónios dopaminérgicos TH positivos. Quanto ao DAT e ao transportador vesicular de monoaminas 2 (VMAT2), o primeiro encontrou-se aumentado, talvez devido ao efeito de sobre-expressão ocasionado por esta molécula, ou ao seu efeito sobre os canais de sódio, pois este pertence a uma família de transportadores dependentes de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . Já os níveis de VMAT2 encontraram-se reduzidos, como consequência da diminuição da sua expressão. Estes fenómenos traduzem-se na perda de neurónios dopaminérgicos, uma vez que aumentam a concentração intracelular de DA, que é citotóxica neste tipo de células, contribuindo para o aparecimento da PD [28].

### 3.1.3 Consequências moleculares e celulares da exposição a Carbamatos

Este grupo de compostos são derivados de ésteres de ácido carbâmico, cuja utilização mundial, se deve ao facto de surgirem como alternativa aos OF na proteção de culturas [12]. São substâncias tóxicas e tal como os OF, atuam como inibidores da AChE, pensando-se também na possibilidade de inibir reversivelmente a esterase alvo neuropática (NTE) [18][29]. A inibição destas enzimas é rapidamente reversível, devido à fácil reativação da enzima carbamilada, com produção de sinais semelhantes aos observados após exposição aguda a OF, apesar dos mesmos se resolverem em algumas horas [29].

#### 3.1.3.1 Rotenona

A rotenona (ROT) é um inseticida natural com capacidade de inibir o complexo I da mitocôndria, apresentando-se como tóxica para os neurónios dopaminérgicos. Esta possui elevada seletividade para com estas células nervosas e devido às suas propriedades lipofílicas facilmente atravessa a BHE. Uma das características inerentes a este composto está relacionada com a sua capacidade em reproduzir modelos de Parkinson, normalmente em roedores, levando mesmo ao aparecimento de características histopatológicas da doença, como os corpos de Lewy.

Para além de afetar o SNC, a ROT exerce efeitos no sistema nervoso periférico, sendo este processo acompanhado por degeneração da via dopaminérgica com ativação da microglia. A infusão subcutânea de ROT em murganhos levou tanto à diminuição da imunoreatividade da TH na 3ª e 6ª semanas, no estriado, como à perda de células TH-positivas pertencentes à *substantia nigra*, na 6ª semana. Este acontecimento está de acordo com o facto de a neurodegenerescência ser progressiva e retrógrada iniciando-se nos terminais nervosos

dopaminérgicos até aos corpos celulares, previamente à perda neuronal na SNpc, excluindo quando se inicia no bulbo olfatório. Existem também outros locais onde foram detetadas evidências neurodegenerativas promovidas pela ROT, como é o caso do cólon ascendente, espinal medula e bulbo olfatório [24].

A partir da inibição do complexo I da mitocôndria podem iniciar-se novos fenómenos capazes de afetar estas células, tais como o stresse oxidativo, agregação de proteínas como a  $\alpha$ -sinucleína, ativação de astrócitos e células da microglia, desenvolvimento do processo inflamatório e apoptose neuronal. Inativando o complexo I da cadeia transportadora de eletrões, dá-se a alteração do Potencial de membrana da mitocôndria (MMP) que, por sua vez, induz a formação de um poro de permeabilidade transicional na membrana, incutindo um estado de transição da permeabilidade da membrana mitocondrial. Devido a esta transição de permeabilidade membranar, pode ocorrer a libertação do citocromo c, dando início à via apoptótica. Para além disso, foi também descoberta a possibilidade desta alteração despoletar a fragmentação de ácido desoxirribonucleico (DNA) e a ativação da caspase-3, contribuindo para a morte dopaminérgica.

Outras das consequências da inibição do complexo I da mitocôndria são, a produção exagerada de ROS, de espécies reativas de nitrogénio e a estimulação da peroxidação lipídica de modo a garantir energia para a célula (ATP). Após exposição crónica à ROT, os modelos expostos à mesma, demonstraram a 30 e a 60 dias um aumento dos níveis de óxido nítrico no estriado e no córtex frontal. Noutros testes observaram-se diminuições na atividade de certas enzimas como a glutathione redutase (GSH) e a superóxido dismutase (SOD), oxidação do DNA e um aumento dos níveis de malondialdeído (MDA). Prova-se, deste modo, que o mecanismo inibitório da ROT pode desencadear um fenómeno de stresse oxidativo que traz efeitos negativos para os neurónios dopaminérgicos. Interligado ao processo de formação de NO e à libertação de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$ , está a origem e manutenção do processo inflamatório.

Uma das características relevantes nos modelos de Parkinson, é a capacidade em formar corpos de Lewy através da sobre-expressão e acumulação de diferentes tipos de proteínas. A génese destes agregados leva, em condições normais, à ativação do UPS que repara e remove proteínas que se encontram nestas condições, ou que se apresentem mal conformadas. A ROT como foi referido anteriormente, leva a um aumento dos níveis de NO e de produção de peróxidos envolvidos na diminuição da atividade proteossómica da subunidade 20S do UPS pela sua degradação. Outro dos mecanismos que se pensa estar envolvido nesta questão, é a alteração da atividade proteossómica pela agregação do proteossoma a proteínas oxidadas resultantes do stresse oxidativo causado pela ROT, ou mesmo por ação direta das ROS no

próprio proteossoma, modificando-o. Os efeitos subjacentes a estes mecanismos, exacerbam a acumulação proteica verificada nos doentes de Parkinson [30].

Destacando novamente os corpos de Lewy e evidenciando que estes são maioritariamente compostos por  $\alpha$ -sinucleína, foi feito um estudo que evocou a relação entre a componente genética e ambiental no desenvolvimento da patologia. Neste, formaram-se 4 grupos diferentes. Um grupo controlo e um grupo de estudo para a ROT, nos quais foi realizada uma infusão intranigral de um vetor viral AAV2/5-GFP. Nos restantes grupos foram administradas infusões intranigrais de vetores virais AAV2/5- $\alpha$ -sinucleína, um para estudo isolado dos efeitos da  $\alpha$ -sinucleína e outra para o estudo da interação simulada da expressão de  $\alpha$ -sinucleína com a presença da ROT. Ao longo do tempo de estudo, as funções motoras em cada um dos grupos foi sendo monitorizada e, no final de 3 meses, seguiu-se a administração de uma dose baixa de ROT por injeção nos terminais nigro-estriados no grupo da ROT e no grupo em que era esperada a combinação desta substância com a  $\alpha$ -sinucleína [31].

Nos grupos que foram somente expostos a um fator,  $\alpha$ -sinucleína ou ROT, não se desenvolveu alteração motora. Já a exposição sequencial demonstrou a capacidade de provocar distúrbios motores e neurodegeneração numa escala muito superior comparativamente com apenas um dos fatores isolados. Este facto foi observado em ratos submetidos a vários testes comportamentais. Em análise *post mortem* verificou-se que a ROT amplificou a degeneração dos neurónios nigro-estriados. Deste modo, podemos inferir que os casos subclínicos ou pré-sintomáticos de parkinsonismo que se devam ao efeito da deposição de  $\alpha$ -sinucleína, podem ser exacerbados e conduzir mais rapidamente a uma forma avançada da doença após exposição a substâncias ativas de PF, como a ROT [31].

### 3.1.3.2 Ziram

O fitofármaco Ziram (ZR) pertence à classe dos ditiocarbamatos, sendo habitualmente utilizado como fungicida. Alguns estudos realizados com base nesta substância, demonstraram as suas propriedades tóxicas perante os neurónios dopaminérgicos. Um dos mecanismos propostos para explicar este aspeto, tem por base a capacidade deste para inibir a E1 ligase do UPS, diminuindo a degradação proteica e aumentando a acumulação de  $\alpha$ -sinucleína, podendo ser apresentada como uma das causas que iniciam a PD.

Num estudo realizado em embriões de peixe zebra (*Danio rerio*), expostos a baixas concentrações desta substância ativa, teve-se por objetivo determinar a neurotoxicidade do mesmo *in vivo*. Esta espécie é uma mais valia para o estudo de toxinas, pois são vertebrados que possuem uma taxa de crescimento rápida com uma rede dopaminérgica muito semelhante à dos mamíferos, tornando-se assim um modelo menos dispendioso do que os habituais

roedores. Uma das características deste modelo é a ausência de um gene que expresse a  $\alpha$ -sinucleína. Deste modo procurou-se relacionar positivamente uma das três isoformas de sinucleína expressas por este organismo com a  $\alpha$ -sinucleína. A isoforma com maiores semelhanças tratou-se da  $\gamma 1$ , que possui uma estrutura quimicamente idêntica à  $\alpha$ -sinucleína. Com a ajuda de um promotor, induziu-se a sobre-expressão desta proteína e observou-se que possui a capacidade de, tal como a proteína de referência, produzir fibrilhas e apresentar neurotoxicidade, sendo que a toxicidade do ZR é dependente da expressão desta isoforma.

Em conformidade com estes resultados, estão outros estudos realizados, nos quais se verificou que o fungicida provocava o aumento de  $\alpha$ -sinucleína em modelos de células nervosas. De modo a determinar mais aprofundadamente o relevo da  $\gamma 1$  no desenvolvimento da neurotoxicidade, recorreu-se a um disruptor molecular, o CLR01, cuja função é promover a desagregação dos agregados proteicos de  $\alpha$ -sinucleína, reduzindo a sua toxicidade. Descobriu-se que o CLR01 é também capaz de inibir a formação de fibrilhas da isoforma  $\gamma 1$ , reduzindo a toxicidade ocasionada por esta estrutura, apontando mais uma vez para a semelhança entre esta isoforma e a  $\alpha$ -sinucleína.

Outra das análises realizadas teve como objeto a análise comportamental do peixe zebra. Verificou-se que o ZR provocava a diminuição da atividade deste ser vivo num ambiente escuro mas, que este efeito não se repetia num ambiente com luz. Este comportamento foi idêntico ao observado após administração de haloperidol, um antagonista da DA, sendo que em ambiente com ausência de luz, este comportamento foi restabelecido após administração de apomorfina, um agonista da DA. Este facto, juntamente com a perda de neurónios dopaminérgicos indicam a existência de um distúrbio pré-sináptico da DA, com origem na exposição ao ZR.

Para além dos mecanismos apresentados para justificar a perda dopaminérgica devido ao contacto com este fungicida, está a inibição da aldeído desidrogenase (ALDH), suscitando a acumulação de um composto tóxico (DOPAL) nos neurónios dopaminérgicos. Atuando em sinergismo com os outros mecanismos propostos, este fenómeno acaba por agravar o efeito do ZR e a sua neurotoxicidade. Deste modo esta substância revela-se capaz de dar origem a doenças neurodegenerativas *in vivo* como é o caso do Parkinson [32].

### 3.1.4 Consequências moleculares e celulares da exposição a Compostos

#### Organoclorados

Os compostos OC, abrangem uma grande diversidade de substâncias, como é o caso dos bifenilos policlorados, ciclodienos, hexaclorobenzenos, o DDT e o seu metabolito diclorodifenildicloroetileno (DDE), entre outros. Estes compostos não são extensamente metabolizados como os OF, o que se traduz num tempo de meia-vida superior, sendo maior a possibilidade de acumulação nos tecidos que envolvem os vários órgãos. Esta característica, juntamente com outras propriedades próprias deste grupo de PF, tais como as características lipofílicas, a elevada estabilidade e o baixo ritmo de eliminação do organismo, levam à sua persistência ambiental e à sua acumulação, sobretudo no tecido adiposo de peixes e na gordura animal, o que acaba por potenciar efeitos tóxicos na cadeia alimentar [23]. Estes fatores levaram a que muitas destas substâncias fossem banidas, apesar de atualmente ainda se encontrarem direcionadas para determinados usos, nomeadamente em países em desenvolvimento, o que permite a sua dispersão no ambiente.

#### 3.1.4.1 Dieldrina

A DLD é um composto organoclorado que foi utilizado globalmente como inseticida [18][33]. Este exerce a sua ação através da inibição dos recetores GABA<sub>A</sub> [33]. Devido às suas propriedades físico-químicas, como as suas características lipofílicas e baixa volatilidade, mas também fruto da sua extensa utilização, esta substância acabou por afetar outras espécies e acumular nos solos, contaminando assim alimentos, recursos hídricos e o próprio ambiente. Devido aos fatores descritos anteriormente, esta ainda é passível de deteção no meio ambiente, apesar de ter sido banida há várias décadas.

Observou-se que este inseticida apesar de estar intimamente ligado à transmissão GABAérgica, apresenta maior toxicidade em neurónios dopaminérgicos. Em culturas de células dopaminérgicas de murganhos e ratos, mostrou-se capaz de desencadear a diminuição da concentração de DA intracelular, com o aumento da concentração dos seus metabolitos, despolarização da membrana das mitocôndrias, produção de ROS, apoptose e ativação da microglia (Figura 2). Aquando da exposição de células PC12 à DLD, notou-se a libertação do citocromo c da mitocôndria e conseqüente ativação de uma cascata de sinalização envolvendo caspases, nomeadamente a caspase-3, resultando num processo apoptótico. Em contra medida, perante a libertação do citocromo c, as células PC12 destacaram um aumento da expressão de Bcl-2, em comparação com as células de controlo, sugerindo que este inseticida tem a capacidade de alterar a função da mitocôndria. A nível nuclear, evidenciou-se a condensação de cromatina, fragmentação do DNA celular e hiperacetilação das histonas H3 e

H4. Foi ainda detetado um aumento da proteína CBP, uma histona acetiltransferase. Ao inibir esta proteína, verificou-se a diminuição da acetilação das histonas, ativação da caspase-3 e fragmentação de DNA nos neurónios dopaminérgicos.

Outro dos efeitos adversos da exposição a este fitofármaco, é a alteração conformacional da  $\alpha$ -sinucleína, promovendo a formação de fibrilhas e a sua deposição. Este acontecimento representa uma das causas para a disfunção do UPS e, juntamente com a sobre-expressão de  $\alpha$ -sinucleína, derivada de outros possíveis fatores externos ou mutações, tornam as células predispostas à via apoptótica. Quanto mais prévio for o contacto com esta substância ativa, maior a probabilidade de vir a desenvolver lesões progressivas numa nova exposição.

Num dos estudos, a exposição perinatal de murganhos, a baixas concentrações de DLD, originou um aumento dos níveis proteicos e de mRNA do DAT e VMAT2 a longo termo, contribuindo para uma maior relação DAT:VMAT2 indicativa de uma maior suscetibilidade destas células nervosas para a neurodegenerescência [18].

Num estudo relativo aos efeitos da exposição da DLD em peixes (peixe zebra), tendo como objeto de estudo o sistema imunitário e particularmente a mitocôndria, concluiu-se que este inseticida, produz alterações nestes alvos que facilitam a gênese de doenças neurodegenerativas. Devido às suas propriedades físico-químicas, este composto incorporou-se rapidamente nos tecidos desta espécie, conseguindo-se assim simular os níveis presentes na natureza, e ultrapassar concentrações consideradas toleráveis para a saúde do Homem,

Em dados provenientes da transcriptómica e proteómica, observou-se que muitos dos genes relacionados com a membrana da mitocôndria e envolvidos na síntese de ATP, incluindo a cadeia transportadora de eletrões, estão representados várias vezes nestes dados o que sugere que a DLD afeta a função mitocondrial a nível da transcrição de genes. Quanto às proteínas envolvidas na síntese da ATP, também foi possível observar alterações na sua expressão, o que acaba por coincidir com a capacidade deste produto fitofarmacêutico em inibir o complexo III da mitocôndria. A diminuição da produção de ATP é um dos efeitos adversos da exposição a esta molécula, acreditando-se que a sua origem se deva à sua capacidade para captar eletrões perto do citocromo b via NADH desidrogenase e succinato desidrogenase.

Apesar de provocar todas estas alterações que se podem correlacionar com a PD, este composto não produziu alterações de comportamento ou motoras *in vivo*, nem perda de neurónios dopaminérgicos e, sendo assim, não existe uma correlação inequívoca entre a DLD e o desenvolvimento da PD [18][33].

### 3.1.4.2 Lindano

O LDN pertence também à classe dos OC, e tal como a DLD, a sua ação é atribuída à capacidade de inibir a transmissão GABAérgica. Os recetores GABA<sub>A</sub> estão intimamente ligados aos canais iónicos de cloro e quando estimulados permitem a abertura dos mesmos e à entrada de iões Cl<sup>-</sup>, levando à hiperpolarização da célula. O LDN liga-se a um local de ligação específico no canal e bloqueia a sua abertura. Este composto possui particularidades específicas, pois é rapidamente absorvido através da pele, mas tal como os outros, o seu local de ação é no SNC. Sintomaticamente, não leva ao aparecimento de tremores, mas desencadeia séries de convulsões em casos de envenenamento, devido à sua ação inibitória sobre o GABA<sub>A</sub> [13].

Para melhor compreender como se desencadeiam os mecanismos pelos quais o LDN contribui para o aparecimento de doenças neurodegenerativas, foi realizado um estudo para determinar as alterações na expressão proteica induzidas pelo mesmo. Neste, ratos adultos foram expostos a uma concentração fixa deste fitofármaco, 2,5 mg/kg, durante 21 dias. Esta exposição tornou-se capaz de desencadear certas respostas no organismo destes modelos *in vivo* como a formação de ROS, a peroxidação lipídica e disfunção do UPS. Dos resultados obtidos podemos concluir que o aumento da formação de ROS e peroxidação lipídica, decorreu da diminuição da concentração de GSH e da expressão de enzimas antioxidantes como é o caso da catalase. Este facto deve-se à capacidade do LDN para alterar o normal funcionamento da mitocôndria, induzindo um cenário de stresse oxidativo.

A desregulação do UPS, pode ser consequência deste mesmo stresse oxidativo, ou resultado da diminuição da expressão de proteínas envolvidas neste sistema, como as enzimas conjugadas da ubiquitina (Ube2N, Ube2L3) e a enzima transportadora da ubiquitina (Ubc3), inferindo uma alteração dos níveis totais de ubiquitina em diferentes regiões do cérebro. Este acontecimento sugere a acumulação de proteínas ubiquitinadas e, juntamente com a menor expressão de chaperonas, indicando um maior número de proteínas desdobradas, o que por sua vez leva ao aumento de proteínas ubiquitinadas, poderão constituir os meios responsáveis pela neurodegeneração. Houve ainda um aumento da expressão de SNCA e de subunidades proteossomais (PSMB4, PSMB6 e PSMA5) na *substantia nigra* e corpo estriado. Estas alterações estão correlacionadas com a formação de corpos de Lewy nestes mesmos locais.

Além das alterações descritas anteriormente, a exposição contínua ao LDN durante o tempo do estudo, provocou também modificações na expressão de proteínas relacionadas com a neurotransmissão colinérgica e dopaminérgica e de proteínas envolvidas na morte neuronal. Analisando o comportamento dos ratos, estes demonstraram uma menor predisposição para a locomoção, e maiores dificuldades em processos de memorização e

aprendizagem. Podemos, assim, concluir que as transmissões dopaminérgicas e colinérgicas foram afetadas, respetivamente, após a exposição a este composto [34].

### 3.1.5 Consequências moleculares e celulares da exposição a Bupiridilos

#### 3.1.5.1 Paraquato

O PQ é a substância ativa de PF com propriedades herbicidas, pertencente à classe química dos bupiridilos. Este é um composto com propriedades neurotóxicas, estando intimamente ligado a casos neurodegenerativos. Estas características foram descobertas a partir da sua semelhança estrutural com o MPP<sup>+</sup>, o metabolito ativo de uma substância neurotóxica frequentemente utilizada para criar modelos de Parkinson, o MPTP [35]. Acredita-se que os efeitos adversos desta molécula se devam a vários fatores que podem estar interligados entre si, como a disfunção mitocondrial, indução de stresse oxidativo, apoptose, autofagia e ainda inibição do UPS [18].

Um dos fatores com maior correlação na origem da PD, é o stresse oxidativo. São diversos os processos que podem estar na génese deste evento, desde o metabolismo oxidativo da DA e consequente produção de ROS, à elevada necessidade de realizar respiração aeróbia e existência de uma elevada concentração de ferro na *substantia nigra*, conduzindo à formação do radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>) pela reação de Fenton. Deste modo, conseguimos detetar uma maior predisposição deste local para a degeneração dopaminérgica. Uma das características mais relevantes deste composto é a sua capacidade para participar em reações de oxidação-redução, passando da forma PQ<sup>2+</sup> para a forma reduzida PQ<sup>•+</sup>. Esta última é rapidamente reoxidada na presença de O<sub>2</sub> regenerando o composto original, com formação do superóxido O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Este último quando se liga à enzima SOD é convertido a peróxido de hidrogénio que na presença de ferro (II), é reduzida ao radical HO<sup>•</sup> que tem a capacidade de interagir diretamente com o DNA, proteínas e lípidos, levando à sua oxidação. Como potencial elemento exacerbante da ação do PQ na introdução de um estado de stresse oxidativo, estão os seus efeitos na enzima GSH, diminuindo-a, com aumento os níveis de GSSG. As ROS provenientes das reações redox deste herbicida, traduzem-se numa maior expressão da NADPH-oxidase, que está envolvida na produção de potenciais mediadores do stress oxidativo como o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. A alteração da expressão pode eventualmente ser resultado da ativação de determinadas vias celulares iniciadas pela PKC delta ou ERK1/2, aumentando a transcrição da NADPH-oxidase, que resultam num aumento de ROS nas células e consequente morte celular.

Como acontece em casos anteriores, o PQ consegue ativar as células da microglia, que se pensa serem responsáveis pela manutenção de um estado neuroinflamatório e pela produção de ROS (Figura 3). Estes eventos são os principais culpados no processo neurodegenerativo,

sendo que as células da microglia contactam diretamente com a substância tóxica, ativando-se e iniciando os eventos referidos a montante, sendo uma das principais causas para a neurodegenerescência. Num dos estudos realizados por Purisai [36], uma única exposição a este fitofármaco, ativou a microglia e induziu um estado de stresse oxidativo, mas só quando houve contacto com um lipopolissacarídeo (LPS), é que ocorreram danos nos neurónios dopaminérgicos, indicando que após uma primeira exposição passa a existir uma maior sensibilidade para outros agentes tóxicos, aumentando a suscetibilidade para a ativação de respostas inflamatórias [18]. Este aumento de sensibilidade foi também comprovado num caso de exposição conjunta deste herbicida com o fungicida maneb. Nessa perspetiva, observou-se que para além de introduzir perda dopaminérgica, esta co-exposição também produziu perda de neurónios adrenérgicos localizados no *locus coeruleus*, sendo este efeito precedente da perda dopaminérgica. A diminuição de neurónios adrenérgicos localizados no *locus coeruleus* pode traduzir-se em sintomas não motores observados nos doentes de Parkinson. O mecanismo responsável por iniciar todo este processo neurodegenerativo conta com a ativação da microglia através da ativação da enzima NADPH-oxidase (Figura 4). Esta enzima ligada à membrana celular, está também presente no sistema imunitário e é ativada com o preceito de aumentar o processo respiratório nos fagócitos, estando também presente em células da microglia. A sua ativação contribui profundamente para a produção de ROS e espécies reativas de nitrogénio que, conjuntamente com outros processos ativos, danificam os neurónios. A ativação desta enzima nos murganhos expostos à combinação dos pesticidas, foi comprovada através da translocação de uma das subunidades citosólicas que compõem esta enzima, a p47<sup>phox</sup>, que se apresenta diminuída no citoplasma, mas aumentada nas membranas. De forma complementar, foi também utilizada uma técnica que permite acompanhar a formação de superóxidos por parte desta enzima, recorrendo a uma marcação fluorescente, que evidenciou o aumento da concentração de superóxidos nos murganhos expostos aos fitofármacos. Foi então administrada apocinina, um inibidor da NADPH-oxidase resultando na diminuição de produtos provenientes da ação enzimática e ainda inibindo a ativação da microglia, pois levou também ao decréscimo do marcador de ativação da microglia, o Iba-1. Além de realizar estas alterações, a apocinina foi capaz de inativar a via NF-κB e consequente libertação de fatores pró-inflamatórios. Pode assim concluir-se, que a ativação da NADPH-oxidase, permite a ativação da microglia, reportando consequências para as células neuronais [37].

Existem outros mecanismos envolvidos no processo neurodegenerativo desencadeados por exposição ao PQ, alguns deles já discutidos anteriormente, como a disfunção mitocondrial, inibição do UPS e morte celular. Pensa-se também na existência de uma outra via degenerativa

envolvendo os recetores NMDA. O PQ é capaz de estimular o efluxo de glutamato a partir de recetores não-NMDA acabando por ativar os recetores NMDA. Assim, passa a ocorrer um maior influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  estimulando a produção de NO, que interage com a mitocôndria, contribuindo para a sua disfunção, ou interagindo com as ROS, com conseqüente produção de peroxinitrito, conduzindo ao aumento de radicais livres [18].

Relativamente à disfunção mitocondrial, o PQ mostrou-se capaz de inibir a atividade do complexo I da mitocôndria (NADH: quinona oxidoreductase) na *substantia nigra*, sendo este um dos aspetos observados em doentes com Parkinson. Esta inibição leva a um aumento da produção de ROS. Para além de inibir o complexo I, este neurotóxico também mostra atividade inibitória sobre o complexo III da mitocôndria, sendo este o mais suscetível à ação do herbicida, que assim inunda as células neuronais com espécies oxidativas [18]. Estes não são os únicos efeitos que o PQ exerce sobre a mitocôndria. A morte celular via mitocondrial, é outro dos eventos iniciados após exposição a este fitofármaco, primeiramente através de alterações na permeabilidade das membranas, com libertação de fatores apoptóticos. Esta permeabilização tem por base a formação de dois tipos de poros, o mPTP, um poro de transição situado na membrana interna da mitocôndria e o MAC, canal indutor de apoptose da membrana externa da mitocôndria. Enquanto que o mPTP permite a passagem não seletiva de solutos de baixa massa molecular, o MAC é grande o suficiente para permitir a passagem e libertação do citocromo c para o citoplasma. Para a formação do MAC presume-se que são necessárias proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, sendo que a constituição do canal ainda não está devidamente definida. Foram ainda relatados aumentos na formação de oligómeros e heterómeros Bax e Bak em células primárias TH positivas [38].

Estes dois canais podem interagir entre si para iniciar o processo apoptótico, sendo necessário um desencadeante do mesmo. Neste caso a chave que inicia o processo é a exposição ao PQ. Por exemplo, apesar da formação do MAC preceder a abertura do mPTP, por vezes, este só é formado após a abertura do poro de transição. Especula-se, também, que o mPTP pode ter a sua abertura condicionada pela oligomerização do Bax. O resultado verificado após exposição ao PQ, foi de que este herbicida provoca a agregação do Bax ou Bak e libertação do citocromo c, na medida em que o primeiro canal a ser desenvolvido é o MAC e só depois há abertura do mPTP. Ao utilizar um bloqueador do mPTP, a ciclosporina A, conseguiu-se inibir o processo apoptótico, ou seja, demonstrou-se a possibilidade de contrariar a abertura do canal induzida pelo PQ, o que vem comprovar o potencial efeito deste tóxico na mitocôndria através da formação destes canais [38].

Continuando com o processo de libertação do citocromo c pela mitocôndria, esta última interage com a Apaf-1 e com a procaspase-9 conduzindo à formação do apoptossoma que

ativa a caspase-3 iniciando a apoptose (Figura 5). O retículo endoplasmático também pode desencadear este processo (Figura 6), tendo como causa o stresse oxidativo, distúrbios no  $Ca^{2+}$ , ou hipoxia, o que leva a uma maior acumulação de proteínas desenroladas que desencadeiam uma resposta de stresse. Esta resposta consiste na ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 que promovem a libertação do citocromo c [18].

Como o PQ reproduz *in vivo* todas as características fenotípicas de um doente com Parkinson, como a redução de neurónios dopaminérgicos, sintomas motores e não motores e agregados de  $\alpha$ -sinucleína com formação de corpos de Lewy, a exposição a este herbicida cria excelentes modelos da doença. Um dos modelos atualmente utilizados que viabilizam o estudo da doença é a *Drosophila melanogaster*. Nesta espécie, a administração de PQ é capaz de promover o aparecimento das principais características da doença através do desenvolvimento de stresse oxidativo, degeneração dopaminérgica, diminuição de DA, aumento dos níveis de DOPAC, alterações motoras e mudanças metabólicas. As mudanças metabólicas, envolvem alterações nos aminoácidos, hidratos de carbono e ácidos gordos. Uma das alterações metabólicas a referir é o acréscimo da concentração de mio-inositol que tem repercussões a nível da atividade motora, sendo que esta alteração pode ser observada em doentes diagnosticados com a doença [35].

Os corpos de Lewy que devem a sua formação a erros estruturais nas proteínas, são normalmente degradados pelo UPS, mas em caso de disfunção deste sistema, estes tendem a acumular no estriado. As causas principais de disfunção deste sistema são a diminuição da produção de ATP devido à disfunção mitocondrial, stresse oxidativo ou mesmo fruto de mutações genéticas. Esta disfunção leva a célula a iniciar um ciclo vicioso, pois, como não consegue degradar o excedente de  $\alpha$ -sinucleína, formam-se agregados que por ação direta sob o componente 20S do proteossoma, diminui o grau de funcionamento do sistema. Estudos recentes mostraram que o PQ provoca a diminuição da atividade proteolítica da subunidade 26S, o que conjuntamente com o aumento de expressão de  $\alpha$ -sinucleína, acresce o risco de desenvolvimento e progressão da doença [18].

### **3.1.6 Evidências epidemiológicas da relação de PF com a doença de Parkinson**

O *Agricultural Health Study* [39], é um caso coorte prospetivo, no qual estão envolvidos agricultores e suas famílias, provenientes do estado do Iowa e Carolina do Norte. Este é um dos maiores estudos realizados e existem várias revisões do mesmo, envolvendo outros parâmetros, pois, neste, o foco era o aparecimento de cancro em agricultores expostos a múltiplos fatores. Este estudo foi realizado entre os anos de 1993 e 1997 e consistiu na realização de questionários e entrevistas telefónicas. Alguns dos dados que foram requisitados,

abordavam questões demográficas, a condição médica, uso de pesticidas, tipo de culturas que tratavam, uso de equipamento de segurança, consumo de frutas e vegetais e ainda consumo de álcool e tabaco. Para melhor compreender o uso de pesticidas foram colocadas perguntas relacionadas com a atividade de preparar ou aplicar os mesmos, o número de anos e a média dos dias por ano em que a pessoa desempenhou essa tarefa, a utilização de alguns pesticidas selecionados e a frequência do seu uso [34][39]. Observou-se que 77% dos inquiridos (cerca de 75 mil), possuíam registo para aplicação de pesticidas, e que a média da duração de utilização destes compostos era de 16 anos [39]. Os seguintes estudos baseados neste estudo principal, Kamel [40] e Tanner [41], demonstraram a importância de diferenciar os casos incidentes dos prevalentes [34]. Na revisão por Kamel, 60 intervenientes do estudo que aplicavam pesticidas e 23 conjugues apresentaram a forma prevalente da PD, enquanto que no acompanhamento do estudo, foram detetados 78 casos incidentes. Dos 90 resultados do estudo existiram 45 OR da prevalência da doença e a exposição a pesticidas, em que 33 foram inferiores a 1,0, 14 foram acima de 1,0 e 8 foram iguais a 1,0. Dos outros 45 resultados, para a incidência do Parkinson no estudo, 16 foram inferiores a 1,0, 22 acima de 1,0 e 7 foram iguais a 1,0. Ou seja, apenas os casos incidentes tiveram uma relação positiva com a exposição a pesticidas, denotando a importância de dividir os casos em grupos de incidência e prevalência [40].

Tanner, realizou também um estudo (caso-controlo) tendo por base o AHS, de modo a determinar se os pesticidas que causam disfunção mitocondrial ou stresse oxidativo estão associados à PD. Neste foi definido um grupo de casos e um grupo de controlo, na proporção de 1:3, baseados no caso coorte descrito anteriormente. Dos 170 casos suspeitos, existiram 115 casos de Parkinson confirmados por neurologistas, sendo que em 110 deles existiam dados acerca dos PF utilizados. De entre os PF capazes de desencadear stresse oxidativo, o PQ mostrou ser aquele com maior significado, o que se evidencia pela sua OR de 2,5 para homens e mulheres e 2,7 apenas para homens. Em caso de uso prolongado deste herbicida, a correlação sofre algumas mudanças, sendo que atinge os 3,6 se o tempo de duração for superior à média e 2,4 se for inferior ou igual à média encontrada no estudo. Para os inibidores do complexo I da mitocôndria os resultados auferidos pela ROT foram os de maior significado, com uma OR de 2,5. É de notar que os resultados para os dois fitofármacos abordados, foram muito semelhantes àqueles que se observaram 5 a 15 anos antes do diagnóstico [34][41].

A exposição ocupacional a PF compõe um enorme risco para o utilizador, caso não sejam tomadas medidas de precaução. Num estudo de revisão com base em publicações de casos coorte da base de dados MEDLINE entre 1966 e 2011, foi observado um aumento substancial no risco de desenvolver Parkinson em 28%, valor que se manteve homogêneo perante os

diferentes estudos. Ao combinar os estudos em que a doença foi diagnosticada por neurologistas, o meta-risco relativo foi de 2,56, o que indica que a exposição ocupacional se traduz num risco aumentado de vir a desenvolver Parkinson [42]. Como reforço do risco desta exposição, foram realizadas compilações de vários estudos resultando em revisões sistemáticas. Numa das publicações foram compreendidos 29 estudos válidos (28 casos controlo e 1 estudo coorte) de entre várias bases de dados, sendo o tamanho do efeito (ES) de 1,42, mostrando mais uma vez a relação positiva entre o uso e exposição a fitofármacos e o Parkinson. Quanto à exposição ocupacional e a mesma doença, os resultados obtidos de 17 casos controlo e 3 casos coorte, mostraram que  $ES=1,49$  [43]. Num estudo realizado com base em 400 idosos residentes na Costa Rica, detetou-se um aumento nos níveis de DLD e  $\beta$ -HCH e diminuição nos níveis de DDT e DDE no soro de 89 dos 400 pacientes em comparação com um estudo anterior realizado na mesma área. O aumento da concentração destes compostos foi acompanhado com o aumento do risco de desenvolver a doença, justificado pelo aparecimento de sintomas específicos da patologia [44].

Outros estudos com elevada importância para expor os riscos da exposição a fitofármacos foram conduzidos por Priyadarshi [45] e Baldi [46]. O primeiro autor focou-se na exposição a fitofármacos e a sua relação com a PD e para tal realizou uma meta análise que envolveu 19 estudos entre 1989 e 1999, acabando por concluir que o aumento do risco de desenvolver Parkinson era consistente entre os estudos, tendo a OR combinada o valor de 1,94 [26][43]. O estudo conduzido por Baldi, designado de PHYTONER [46], foi realizado com a participação de 929 trabalhadores vinícolas com uma idade média de 50 anos e que tivessem pelo menos 20 anos no desempenho daquela atividade. Os indivíduos foram então separados consoante o grau de exposição, não existente, direta e indireta e após 4 anos voltaram a ser examinados (apenas 614 indivíduos), recorrendo a questionários e testes que avaliaram o comportamento neuronal. Em comparação com o grupo dos não expostos, os resultados mostraram a existência de declínio cognitivo associado ao uso crónico de pesticidas, sendo que o grupo dos indivíduos expostos mostrou um declínio cognitivo e motor mais rápido. Os resultados obtiveram maior pronúncia em mulheres, indivíduos com um nível de educação elevado e que não consumiam álcool [47]. Num outro estudo com a mesma autoria, reportou-se um maior risco para os Homens com mais de 65 anos de virem a despoletar a doença devido a fenómenos de exposição ocupacional a pesticidas, sendo o RR de 5,63 [26][48].

Uma via importante que faz parte da exposição aos fitofármacos é a sua ingestão. A ingestão destas substâncias, pode ser realizada através do consumo de água contaminada pelas mesmas, providenciada pela sua taxa de adsorção e tempo de meia-vida neste meio. Foram realizados estudos, nos quais se percebeu que o risco de consumo de água de poços, aumentava o risco

de desencadear um processo neurodegenerativo como o Parkinson. Uma vez mais, Priyadarshi [49] associou estes dois termos numa meta-análise reportando uma OR de 1,20 proveniente de vários estudos. Também um estudo sérvio apoia este risco expondo uma OR de 2,62 [26].

### **3.2 A doença de Alzheimer como consequência da exposição a fitofármacos**

A AD é uma patologia crónica, complexa, multifatorial e irreversível, marcada pela perda progressiva de memória e capacidade cognitiva, colocando em causa os hábitos pessoais e a aptidão para desempenhar certas tarefas [18]. Estima-se que contribua em cerca de 60-70% para os casos de demência a nível mundial, e que o número de afetados chegue aos 106 milhões em 2050 [22][50].

Existem duas formas de Alzheimer, uma denominada de familiar ou de início precoce, a qual tem início antes dos 65 anos de idade e explica apenas 5% dos casos. Esta forma está relacionada com a existência de mutações genéticas autossómicas dominantes em três genes, o gene da proteína precursora amiloide (APP), da presenilina 1 (PSEN 1) e da presenilina 2 (PSEN 2) envolvidas na síntese do peptídeo beta-amiloide ( $A\beta$ ) [22]. A forma mais prevalente da doença é a forma esporádica ou de início tardio, sendo esta, então, a forma mais comum. Apesar de não estar diretamente ligada à existência de mutações genéticas, esta forma pode ser comprometida por alguns fatores genéticos como o polimorfismo na apolipoproteína E (APOE), nomeadamente se estiver presente um ou dois alelos  $\epsilon 4$  [51].

Relacionadas com a etiologia desta doença, estão duas hipóteses. Uma delas é alusiva à expressão da  $\gamma$ - e da  $\beta$ -secretase, proteases aspárticas que clivam APP com libertação do peptídeo  $A\beta$  insolúvel, responsável pela formação de placas e agregados senis amilóides que comprometem progressivamente a normalidade da célula e a comunicação nervosa. A outra hipótese está relacionada com a proteína Tau, que é responsável pela formação e estabilização dos microtúbulos dos axónios. A hiperfosforilação de resíduos de aminoácidos (serina e treonina) da proteína Tau, por cinases específicas, leva à sua agregação e deposição, sob a forma de emaranhados neurofibrilares insolúveis. São estes depósitos que iniciam determinadas lesões nos locais onde se acumulam, culminando na morte de neurónios e bloqueio de sinapses, pontos característicos desta patologia [22].

Outro mecanismo que desregulado pode levar ao aparecimento da AD, conduzindo à morte de neurónios e sinapses em várias regiões do cérebro, nomeadamente na região do córtex e hipocampo, é a disfunção colinérgica. A acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores do cérebro e possui recetores em várias regiões do SNC, desempenhando um papel importante na aprendizagem e na memória. Os neurónios

colinérgicos, para além destas tarefas, estão envolvidos noutros processos fisiológicos, comportamentais e cognitivos, portanto uma vez afetados pela neurodegenerescência, levam a alterações nestes domínios [51].

Apesar de se equacionar a relação entre a utilização de PF e a AD, com base em estudos epidemiológicos e com fundamento em algumas classes de fitofármacos, como é o caso dos OF, não se conhecem, para já, outras evidências pré-clínicas ou clínicas que permitam estabelecer uma relação de causalidade inequívoca entre os diferentes PF e a AD.

Os OF, são a classe de fitofármacos para a qual existe maior correlação com a AD. Pela sua toxicidade foram largamente utilizados sob diversas formas e para diversos fins, desde a sua utilização como inseticidas até ao uso como arma química, como é o caso do gás sarin. Os OF utilizados para fins de proteção de plantas têm uma toxicidade muito inferior aos agentes nervosos usados em armas químicas, mas, apesar disso, em caso de exposição aguda levam a efeitos neurológicos prolongados.

A maior parte destes compostos, tais como o paratião, o diazinão, o malatião e o clorpirifos (CLO), contêm uma extremidade com a ligação P=S. São normalmente metabolizados por enzimas da família CYP450, sofrendo uma dessulfuração oxidativa, onde o átomo enxofre dá lugar ao átomo de oxigénio. Estes metabolitos, oxões, são hidrolisados por fosfodiesterases, como o caso da PON I. O seu mecanismo de ação envolve fundamentalmente a inibição de acetilcolinesterases (AChE), traduzindo-se numa acumulação de ACh na fenda sináptica e consequente aumento de estimulação de neurónios colinérgicos, nervos e músculos ao longo do SNC, periférico e autónomo [20]. Existe deste modo uma elevada morbidade e mortalidade associada a intoxicações com este tipo de produtos, colocando no pódio do risco os agricultores, nomeadamente aqueles que trabalham em campos de agricultura intensiva e em países em vias de desenvolvimento onde não existe um controlo rígido da utilização destes compostos [51].

Embora muitos dos sintomas tenham como causa os efeitos colinérgicos, existem novas evidências de mecanismos não colinérgicos, associadas a uma exposição prolongada a baixas concentrações aos *parent compounds* e não aos oxões, apesar destes últimos serem mais potentes. Em estudos *in vitro*, revelou-se que o oxão do clorpirifos (CLO) está envolvido na inibição da síntese de DNA em linhas celulares de glioma. Contudo, o próprio CLO, inibe a replicação e diferenciação das células da glia por afetar a integridade das redes de microtúbulos, incluindo a tubulina, e reduzindo a proteína ácida fibrilar glial (GFAP) presente no seu citoesqueleto [18].

Estudos em ratos, mostram que os OF, inibidores das AChE, aumentam os níveis de APP no cérebro, facto correlacionado com o aumento dos níveis de peptídeo A $\beta$ . Num dos estudos

realizados em que houve exposição ao CLO, juntamente com infusões cérebro-ventriculares de peptídeo A $\beta$ , desenvolveram-se alterações comportamentais e de memória nos ratos. Estas alterações, juntamente com a redução de determinadas proteínas associadas aos microtúbulos, comprovam alguns aspetos descritos anteriormente, dos quais este grupo de compostos é responsável. Outras evidências foram encontradas, recorrendo a modelos *in vivo* com ratos *wild type* e ratos transgênicos com a mutação específica para o tipo familiar da AD. Após exposição ao CLO, observaram-se alterações nos níveis de proteína A $\beta$  e nos processos de memorização, sendo que estas alterações foram apenas observadas nos ratos *wild type* [51].

Num cenário de exposição a este grupo de fitofármacos, foi também possível observar disfunção mitocondrial, com aumento do *uptake* de cálcio, alteração do MMP, stresse oxidativo, peroxidação lipídica, iniciação da via apoptótica após libertação do citocromo c e ainda perturbações no transporte axonal de forma semelhante à que se encontra na AD [20]

### **3.2.1 Evidências epidemiológicas da relação de Produtos Fitofarmacêuticos com a doença de Alzheimer**

Embora a maioria dos estudos seja centrada na PD, o uso de fitofármacos está também associado à AD. Um dos maiores estudos que relaciona estes dois parâmetros foi realizado por Baldi e teve o nome de PAQUID [46], que envolveu o seguimento por cinco anos de 1507 adultos franceses. Este estudo prospetivo reportou um RR de 2,4 perante a AD, apresentando também uma menor performance dos pacientes no MMSE (*Mini mental State Examination*).

O estudo *Cache County* [52][53] contou com a participação de 5092 residentes em Cache County no Utah. Os participantes foram submetidos a uma avaliação modificada do MMSE e a questionários, sendo reavaliados aos 3, 7 e 10 anos após o início do estudo. Apesar de apenas 60,5% dos participantes iniciais terem concluído o estudo, os resultados foram de encontro ao esperado com uma associação positiva para a AD, com *hazard ratio* (HR) de 1,42 [47]. Uma revisão da literatura recorrendo a bases de dados como o PUBMED, EMBASE entre outras, das quais se retiraram com base em critérios de seleção para estudo específico, 3 casos coorte e 4 casos controlo acerca da associação entre a exposição a fitofármacos e o desenvolvimento da AD. As conclusões retiradas envolveram a diminuição da capacidade cognitiva de grupos expostos relativamente a não expostos, a existência de um maior risco em agricultores e jardineiros e ainda um aumento do risco de aparecimento dos vários tipos de demência num cenário de exposição a substâncias ativas de PF, em que o HR = 1,38. Em suma, os dados combinados resultaram novamente numa associação positiva entre a exposição a fitofármacos e a AD, com apresentação de uma OR geral de 1,34 [54].

#### 4. Conclusão

Ao longo deste trabalho foram descritas inúmeras evidências de risco baseadas em estudos *in vitro*, *in vivo* e estudos epidemiológicos, indiciadoras ou demonstrativas da relação de causalidade entre a exposição a fitofármacos e a prevalência de doenças neurodegenerativas. Desde logo, é evidente a necessidade de novos e diversificados estudos prospetivos, conduzidos de forma rigorosa e concisa, envolvendo um número significativo de casos com diagnósticos inequívocos e com recurso a métodos inquestionáveis demonstrativos de exposição a PF. É de extrema importância que os estudos sejam desenhados para recolher informações de longo prazo, nomeadamente, acerca do início da exposição, sobre a possível influência de outros fatores etiológicos na doença, do estilo de vida, etc... De modo a clarificar a exposição e eliminar potenciais erros, estes também deverão ter em conta os eventuais polimorfismos genéticos das populações em estudo e abordar classes específicas de fitofármacos [26][34][42][43][47].

Resulta também, evidente, a necessidade de reduzir a exposição a este tipo de produtos, assegurando, contudo, estratégias de agricultura sustentável, dada a necessidade de satisfazer as necessidades alimentares das populações e a importância da proteção das culturas. Uma das medidas é a priorização de meios não químicos para a preservação de culturas contra agentes nocivos, o que inclui a utilização de meios de luta cultural, biológica e biotécnica. A luta cultural fomenta a utilização de medidas naturais como a rotação de culturas, a adaptação do solo à cultura em vista e a utilização de sementes certificadas. A luta biológica passa pela utilização de outros organismos vivos que eliminam os agentes nocivos através da predação dos mesmos, ou mesmo atuando como agentes patogénicos em certas espécies. Já a luta biotécnica envolve a utilização de agentes que interferem no ciclo de vida ou funções metabólicas dos organismos que ameaçam as culturas, por vezes conduzindo à sua morte. Neste método, utilizam-se reguladores de crescimento de insetos e produtos semioquímicos como as feromonas ou mesmo desencadeando uma luta autócida, sendo um exemplo desta, a esterilização de machos e sua dispersão em zonas estratégicas, tendo em vista a competição sexual, com deposição de ovos inférteis [8].

O desenvolvimento e utilização de PF com maior especificidade para o alvo e com menor toxicidade ambiental e humana, constituem uma das alterações necessárias para reduzir o risco associado à utilização destes produtos. Outro dos aspetos a ter em conta, são os LMRs, que com o crescimento de evidências acerca dos efeitos adversos da utilização de fitofármacos e dados toxicológicos, devem ser atualizados e revistos. Para além destas medidas e parâmetros, é indispensável fornecer formação profissional agrícola às pessoas envolvidas nestes processos, acerca da correta utilização de equipamentos e sob as medidas de segurança

a utilizar na preparação, aplicação, armazenamento e transporte deste tipo de produtos. Para a restante população é necessário melhorar a educação básica de modo a que tenham a ideia correta sobre os PF, os seus riscos, benefícios e para que se consiga uma utilização racional dos mesmos. Conceitos fundamentais e de carácter muito básico, tais como o tempo de persistência ou o intervalo de segurança dos PF, têm que ser divulgados e integrados no conhecimento essencial sobre segurança alimentar. O governo português, nomeadamente através da Direção Geral de Alimentação e Veterinária concebeu um Plano de Ação Nacional (PAN) [55] acerca do uso sustentável de PF com as possíveis medidas a adotar ao nível de todos os envolvidos no processo.

O farmacêutico também poderá desempenhar o seu papel como agente de saúde pública contribuindo para as estratégias de produção integrada, de modo a alcançar a meta de uma agricultura sustentável, com diminuição do risco de exposição ambiental e humana a fitofármacos. Cabe a esta classe, nomeadamente aos farmacêuticos que exercem a sua profissão em áreas rurais com maior contacto com a atividade agrícola, informar e aconselhar acerca da correta preparação e utilização destes produtos, alertar a população para os riscos no contexto da segurança ocupacional e alimentar, com especial atenção para a correta interpretação do tempo de intervalo de segurança e dos limites máximos residuais, a que estas formulações devem obedecer. Para além disso, os farmacêuticos são profissionais altamente qualificados que podem integrar equipas de investigação, tendo como objetivo a obtenção de PF com maior perfil de segurança e especificidade, ou mesmo investigando evidências de risco, aumentando a consciencialização geral para os efeitos provocados pelos fitofármacos no organismo humano, com especial atenção para as doenças neurodegenerativas, devido à sua elevada prevalência e falta de compreensão.

## Bibliografia

- [1] United Nations. **Department of Economic and Social Affairs - World population projected to reach 9.7 billion by 2050** [Acedido a 20 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: <http://www.un.org/en/development/desa/news/population/2015-report.html>
- [2] Food and Agriculture Organization of the United Nations - **Global agriculture towards 2050** [Acedido a 20 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: [http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues\\_papers/HLEF2050\\_Global\\_Agriculture.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/Issues_papers/HLEF2050_Global_Agriculture.pdf)
- [3] World Health Organization - **Pesticide Residues in food** [Acedido a 23 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/pesticide-residues-food/en/>
- [4] European Environment Agency - **Pesticide Sales** [Acedido a 21 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: <https://www.eea.europa.eu/airs/2016/environment-and-health/pesticides-sales>
- [5] Eurostat - **Agri-environmental indicator - consumption of pesticides** [Acedido a 20 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental\\_indicator\\_-\\_consumption\\_of\\_pesticides](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides)
- [6] Directiva 91/414/CEE do Conselho, de 15 de julho, relativa à colocação de Produtos fitofarmacêuticos no mercado. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias* n.º **L 230/1** de 19.08.1991
- [7] Decreto-Lei n.º 341/98: estabelece os Princípios Uniformes relativos à avaliação e autorização dos Produtos fitofarmacêuticos para a sua colocação no mercado. *Diário da República* n.º **255/98**, I Série-A, 4. 11.1998
- [8] SIMÕES, J. S. - **Utilização de Produtos Fitofarmacêuticos na Agricultura**. 1ª Edição. Porto: SPI – Sociedade Portuguesa de Inovação, 2005. ISBN 97[29]589484.
- [9] European Commission - **Authorisation of Plant Protection Products** [Acedido a 21 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/authorisation\\_of\\_ppp\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/authorisation_of_ppp_en)
- [10] World Health Organization - **WHO Training Package for the Health Sector – Pesticides, Children’s Health and the Environment** [Acedido a 23 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: <http://www.who.int/ceh/capacity/Pesticides.pdf>

- [11] IUPAC - **History of Pesticide Use** [Acedido a 25 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: [http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com\\_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31](http://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31)
- [12] ABREU-VILLAÇA, Y.; LEVIN, E. D. - Developmental neurotoxicity of succeeding generations of insecticides. *Environment International*. 99, (2016), 55–77.
- [13] COSTA, L. G. - The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. *Handbook of Clinical Neurology*. 131, (2015), 135-148.
- [14] Stockholm Convention - **All POPs listed in the Stockholm Convention** [Acedido a 23 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: <http://chm.pops.int/TheConvention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>
- [15] European Commission - **Approval of Active substances** [Acedido a 26 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval\\_active\\_substances\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/approval_active_substances_en)
- [16] European Commission - **Procedure to apply for authorisation of a PPP** [Acedido a 26 de fevereiro de 2017] Disponível na Internet: [https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/authorisation\\_of\\_ppp/application\\_procedure\\_en](https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/authorisation_of_ppp/application_procedure_en)
- [17] União Europeia - Diretiva n° 98/83/CE do Conselho, de 5 de dezembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal oficial n° L 330* de 5.12.1998
- [18] BALTAZAR, M. T.; DINIS-OLIVEIRA, R. J.; BASTOS, M. L.; TSATSAKIS, A. M.; DUARTE, J. A.; CARVALHO, F. - Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases-A mechanistic approach. *Toxicology Letters*. 230, 2 (2014), 85–103.
- [19] HEUSINKVELD, H. J.; BERG, M. V. D.; WESTERINK, R. H. S. - In vitro dopaminergic neurotoxicity of pesticides: a link with neurodegeneration?. *The Veterinary quarterly*. 34, 3 (2014), 120-131.
- [20] ANDROUTSOPOULOS, V. P.; HERNANDEZ, A. F.; LIESIVUORI, J.; TSATSAKIS, A.M. - A mechanistic overview of health associated effects of low levels of organochlorine and organophosphorous pesticides. *Toxicology*. 307, (2013), 89-94.
- [21] MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. - Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 268, 2 (2013), 157–177.

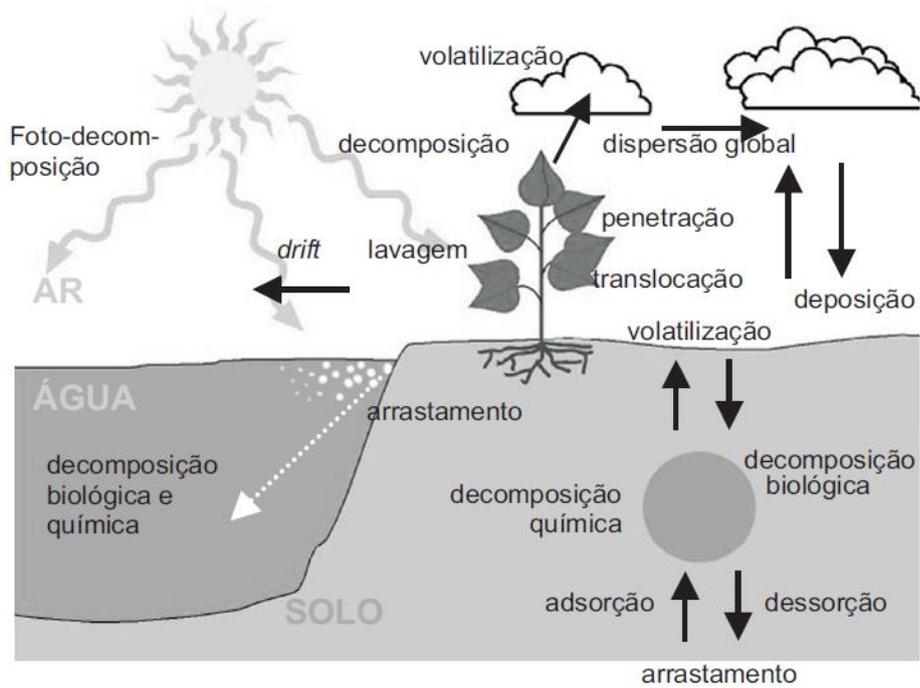
- [22] CHIN-CHAN, M.; NAVARRO-YEPES, J.; QUINTANILLA-VEGA, B. - Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*. 9, 124 (2015), 1-22.
- [23] SARAVI, S. S.; DEHPOUR, A. R. - Potential role of organochlorine pesticides in the pathogenesis of neurodevelopmental, neurodegenerative, and neurobehavioral disorders: A review. *Life Sciences*. 145, (2015), 255-264.
- [24] MURAKAMI, S.; MIYAZAKI, I.; MIYOSHI, K.; ASANUMA, M. - Long-Term Systemic Exposure to Rotenone Induces Central and Peripheral Pathology of Parkinson's Disease in Mice. *Neurochemical Research*. 40, 6 (2015), 1165–1178.
- [25] DARDIOTIS, E.; XIROMERESIOU, G.; HADJICHRISTODOULOU, C.; TSATSAKIS, A. M.; WILKS, M. F.; HADJIGEROGIOU, M. - The interplay between environmental and genetic factors in Parkinson's disease susceptibility: The evidence for pesticides. *Toxicology*. 307, (2013), 17-23.
- [26] FREIRE, C.; KOIFMAN, S. - Pesticide exposure and Parkinson's disease: Epidemiological evidence of association. *Neurotoxicology*. 33, 5 (2012), 947-971.
- [27] HOSSAIN, M. M.; LIU, J.; RICHARDSON, J. R. - Pyrethroid insecticides directly activate microglia through interaction with voltage-gated sodium channels. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 155, 1 (2016), 112-123.
- [28] XIONG, J.; ZHANG, X.; HUANG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z.; LIU, L.; ZHANG, G.; YANG, J.; ZHANG, Z.; ZHANG, Z.; LIN, Z.; XIONG, N.; WANG, T. - Fenpropathrin, a Widely Used Pesticide, Causes Dopaminergic Degeneration. *Molecular Neurobiology*. 53, 2 (2016), 995–1008.
- [29] COSTA, L. G. et al. - Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience*. 13, (2008), 1240-1249.
- [30] XIONG, N.; LONG, X.; XIONG, J.; JIA, M.; CHEN, C.; HUANG, J.; GHOORAH, D.; KONG, X.; LIN, Z.; WANG, T. - Mitochondrial complex I inhibitor rotenone-induced toxicity and its potential mechanisms in Parkinson's disease models. *Critical Reviews in Toxicology*. 42, 7 (2012), 613-632.
- [31] NAUGHTON, C.; O'TOOLE, D.; KIRIK, D.; (DR.) DOWD, E. - Interaction between subclinical doses of the Parkinson's disease associated gene,  $\alpha$ -synuclein, and the pesticide, rotenone, precipitates motor dysfunction and nigrostriatal neurodegeneration in rats. *Behavioural Brain Research*. 316, (2017), 160–168.

- [32] LULLA, A.; BARNHILL, L.; BITAN, G.; IVANOVA, M. I.; NGUYEN, B.; O'DONNELL, K.; STAHL, M. C.; YAMASHIRO, C.; KLÄRNER, FRANK-G.; SCHRADER, T.; SAGASTI, A.; BRONSTEIN, J. M. - Neurotoxicity of the Parkinson's Disease-Associated Pesticide Ziram is Synuclein Dependent. *Environmental Health Perspective*. 124, 11 (2016), 1766 – 1775.
- [33] COWIE, A. M.; SARTY, K. I.; MERCER, A.; KOH, J.; KIDD, K. A.; MARTYNIUK, C. J. - Molecular networks related to the immune system and mitochondria are targets for the pesticide dieldrin in the zebrafish (*Danio rerio*) central nervous system. *Journal of Proteomics*. 157, (2017), 71–82.
- [34] MANDEL, J. S.; ADAMI, H. O.; COLE, P. - Paraquat and Parkinson's disease: An overview of the epidemiology and a review of two recent studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 62, 2 (2012), 385-392.
- [35] SHUKLA, A. K.; RATNASEKHAR, C.; PRAGYA, P.; CHAOUHAN, H. S.; PATEL, D. K.; CHOWDHURI, D. K.; MUDIAM, M. K. R. - Metabolomic Analysis Provides Insights on Paraquat-Induced Parkinson-Like Symptoms in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Neurobiology*. 53, 1 (2016), 254-269.
- [36] PURISAI, M.G.; MCCORMACK, A. L.; CUMINE, S.; LI, J.; ISLA, M. Z., DI MONTE, D. A. - Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. *Neurobiology of Disease*. 25, 2 (2007), 392-400.
- [37] HOU, L.; ZHANG, C.; WANG, K.; LIU, X.; WANG, H.; CHE, Y.; SUN, F.; ZHOU, X.; ZHAO, X.; WANG, Q. - Paraquat and maneb co-exposure induces noradrenergic locus coeruleus neurodegeneration through NADPH oxidase-mediated microglial activation. *Toxicology*. 380, (2017), 1-10.
- [38] HUANG, C.-L.; CHAO, C.-C.; LEE, Y.-C.; LU, M.-K.; CHENG, J.-J.; YANG, Y.-C.; WANG, V.-C.; CHANG, W.-C.; HUANG, N.-K. - Paraquat Induces Cell Death Through Impairing Mitochondrial Membrane Permeability. *Molecular Neurobiology*. 53, 4 (2016), 2169–2188.
- [39] ALAVANJA, M. C.; SANDLER, D. P.; MCMASTER, S. B.; ZAHM, S. H.; MCDONNELL, C. J.; LYNCH, C. F.; PENNYBACKER, M.; ROTHMAN, N.; DOSEMECI, M.; BOND, A. E.; BLAIR, A. - The agricultural health study. *Environmental Health Perspectives*. 104, 4 (1996), 362-369.

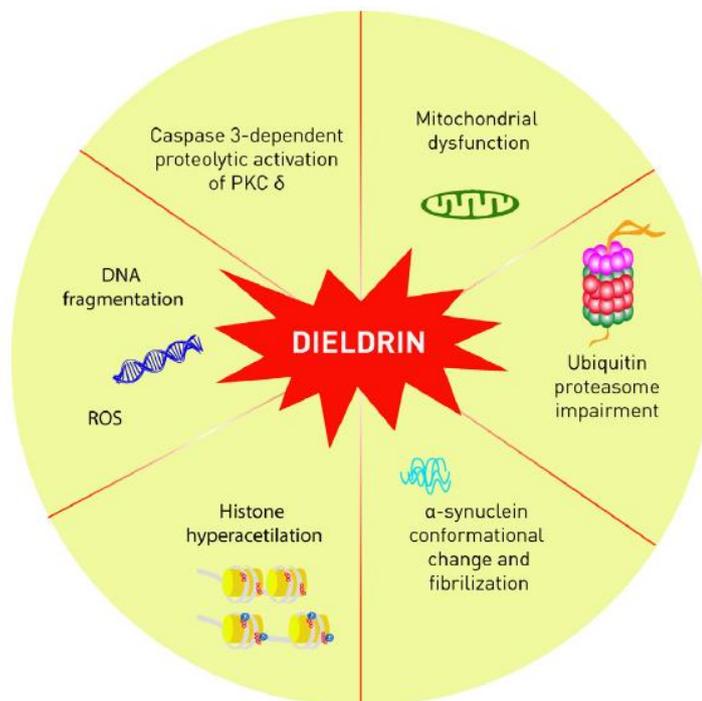
- [40] KAMEL, F.; TANNER, C. M.; UMBACH, D. M.; HOPPIN, J. A.; ALAVANJA, M. C. R.; BLAIR, A.; COMYNS, K.; GOLDMAN, S. M.; KORELL, M.; LANGSTON, J. W.; ROSS, G.W.; SANDLER, D. P. - Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the Agricultural Health Study. *American Journal of Epidemiology*. 165, 4 (2007), 364-374.
- [41] TANNER, C.; KAMEL, F.; ROSS, G. W.; HOPPIN, J. A.; GOLDMAN, S. M.; KORELL, M.; MARRAS, C.; BHUDHIKANOVA, G. S.; KASTEN, M.; CHADE, A. R.; COMYNS, K.; RICHARDS, M. B.; MENG, C.; PRIESTLEY, B.; FERNANDEZ, H. H.; CAMBI, F.; UMBACH, D. M.; BLAIR, A.; SANDLER, D.P; LANGSTON, J. W. - Rotenone, paraquat and Parkinson's disease. *Environmental Health Perspectives*. 119, 6 (2011), 866-872.
- [42] MAELE-FABRY, G. V.; HOET, P.; VILAIN, F.; LISON, D. - Occupational exposure to pesticides and Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Environment International*. 46, (2012), 30–43.
- [43] ALLEN, M. T.; LEVY, L. S. - Parkinson's disease and pesticide exposure – a new assessment. *Critical Reviews in Toxicology*. 43, 6 (2013), 515–534.
- [44] STEENLAND, K.; MORA, A. M.; BARR, D. B.; JUNCOS, J.; ROMAN, R.; WESSELING, C. - Organochlorine chemicals and neurodegeneration among elderly subjects in Costa Rica. *Environmental Research*. 134, (2014), 205–209.
- [45] PRIYADARSHI, A.; KHUDER, S. A.; SCHAUB, E. A.; SHRIVASTAVA, S. - A meta-analysis of Parkinson's disease and exposure to pesticides. *Neurotoxicology*. 21, 4 (2000), 435-440.
- [46] BALDI, I.; GRUBER, A.; RONDEAU, V; LEBAILLY, P.; BROCHARD, P.; FABRIGOULE, C. - Neurobehavioral effects of long-term exposure to pesticides: results from the 4-year follow-up of the PHYTONER Study. *Occupational Environmental Medicine*. 68, 2 (2011), 108–115.
- [47] ZAGANAS, I.; KAPETANAKI, S.; MASTORODEMOS, V.; KANAVOURAS, K.; COLOSIO, C.; WILKS, M. F.; TSATSAKIS, A. M. - Linking pesticide exposure and dementia: What is the evidence?. *Toxicology*. 307, (2013), 3–11.
- [48] BALDI, I.; LEBAILLY, P.; MOHAMMED-BRAHIM, B.; LETENNEUR, L.; DARTIQUES, J. F.; BROCHARD, P. - Neurodegenerative Diseases and Exposure to Pesticides in the Elderly. *American Journal of Epidemiology*. 157, 5 (2003), 409-414.
- [49] PRIYADARSHI, A.; KHUDER, S. A.; SCHAUB, E. A.; PRIYADARSHI, S. S. - Environmental risk factors and Parkinson's disease: a meta-analysis. *Environmental Research*. 86, 2 (2001), 122-127.

- [50] YEGAMBARAM, M.; MANIVANNAN, B; BEACH, T. G.; HALDEN, R. U. - Role of Environmental Contaminants in the Etiology of Alzheimer's Disease: A Review. *Current Alzheimer Research*. 12, 2 (2015), 116-146.
- [51] SÁNCHEZ-SANTED, F.; COLOMINA, M. T.; HERNÁNDEZ, E. H. - Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*. 74, (2016), 417-426.
- [52] HAYDEN, K. M.; NORTON, M. C.; DARCEY, D.; OSTBYE, T.; ZANDI, P. P.; BREITNER, J. C.; WELSH-BOHMER, K. A.; - Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: the Cache County study. *Neurology*. 74, 19 (2010), 1524–1530.
- [53] JONES, N. - Alzheimer disease: risk of dementia and Alzheimer disease increases with occupational pesticide exposure. *Nature Reviews. Neurology*. 6, 7(2010), 353.
- [54] YAN, D.; ZHANG, Y.; LIU, L.; YAN, H. - Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: a systematic review and meta-analysis. *Scientific Reports*. 6, 32222 (2016), 1-9.
- [55] DGAV. **Plano de Ação Nacional Para o Uso Sustentável dos Produtos Fitofarmacêuticos: Estabelecimento e Implementação**. Lisboa: DGAV, 2013.

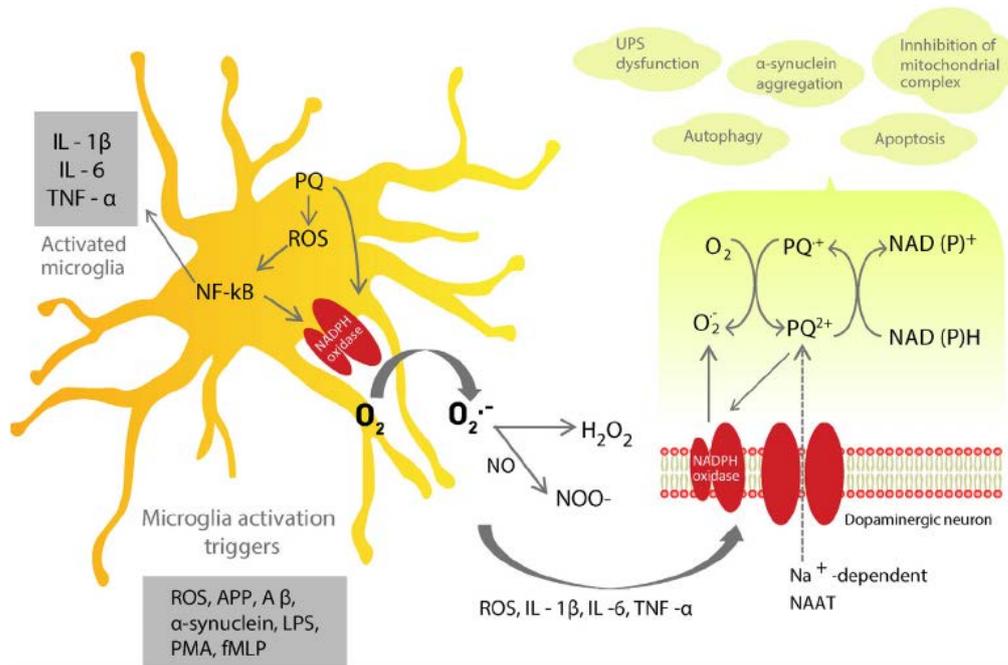
**Anexos**  
**Figuras**



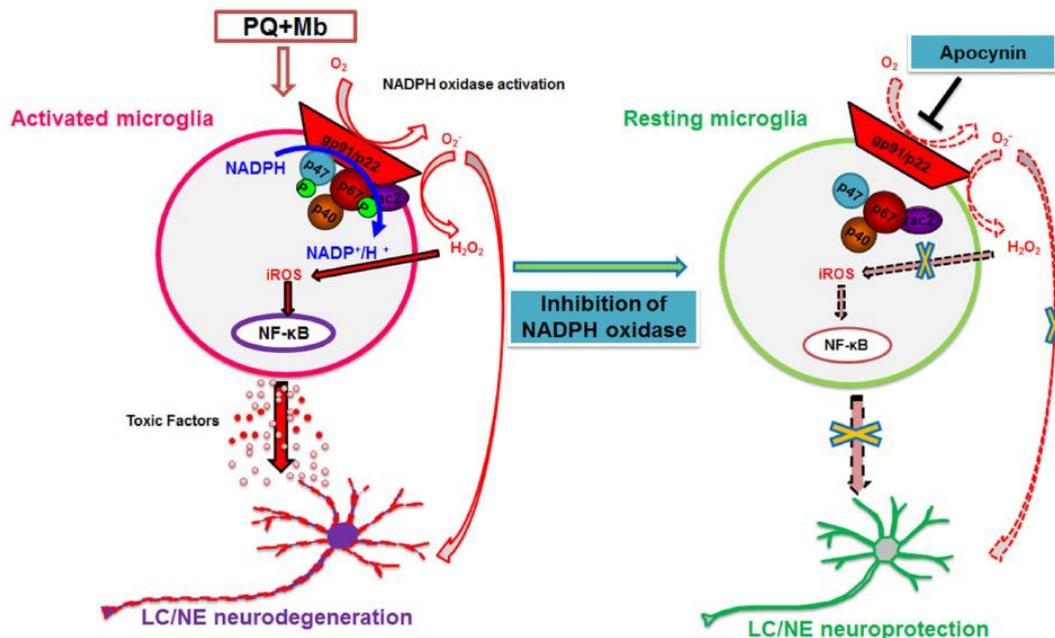
**Figura 1:** Processos de distribuição dos PF no meio ambiente (Retirado de [8]).



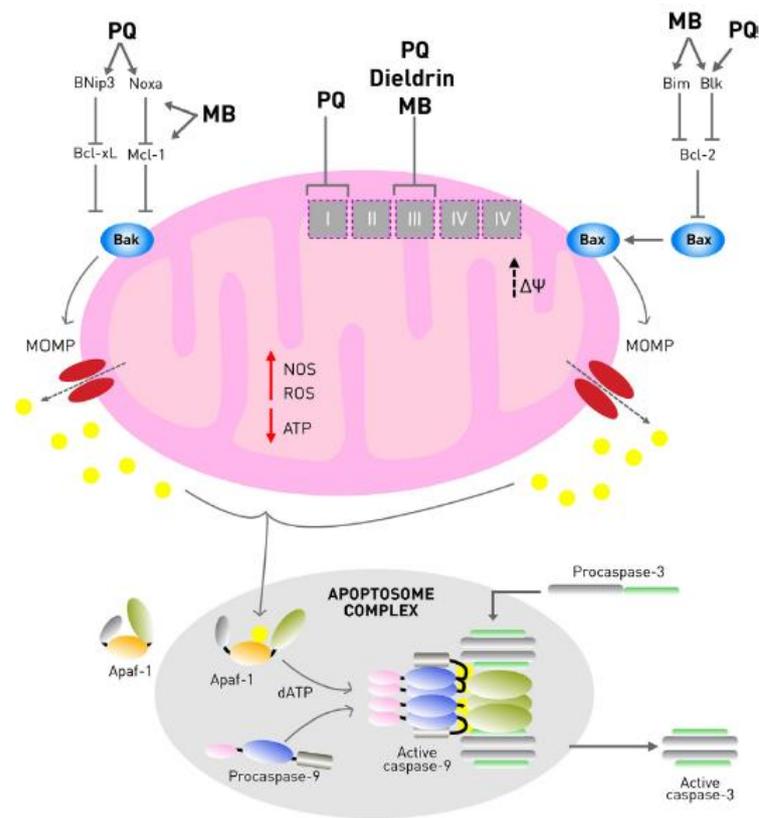
**Figura 2:** Consequências da exposição à dieldrina ao nível das células nervosas (Retirado de [18]).



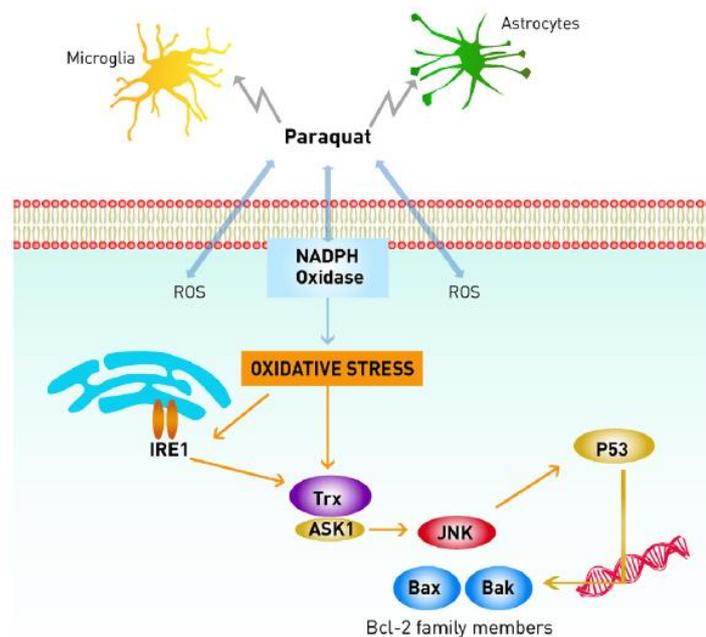
**Figura 3:** O paraquato revela-se capaz de ativar as células da microglia, resultando num aumento de ROS e fatores pró-inflamatórios. Estas moléculas, aumentam a expressão da NADPH-oxidase, que, juntamente com o efeito do paraquato nos neurónios dopaminérgicos, contribuem para a geração de ROS e, conseqüente degeneração dopaminérgica (Retirado de [28]).



**Figura 4:** Ativação da NADPH-oxidase através do contacto com os compostos paraquato e maneb, com produção extracelular de superóxido e ativação da microglia. A ativação da microglia tem como consequência a produção de ROS intracelular e ativação da via NF-KB, que por sua vez induz a libertação de fatores pró-inflamatórios. A apocinina tem a capacidade de inibir a ativação da NADPH-oxidase, exercendo um efeito neuroprotector sobre os neurónios noradrenérgicos do *locus coeruleus* (Retirado de [23]).



**Figura 5:** Disfunção mitocondrial provocada por exposição a diferentes tipos de PF, incluindo o paraquato, maneb e dieldrina, e consequente iniciação da via apoptótica (Retirado de [28]).



**Figura 6:** Indução de uma cascata de sinalização de morte celular provocada por um fenômeno de stress oxidativo no retículo endoplasmático, devido à exposição ao paraquato (Retirado de [28]).