



Ana Maria de Sousa Almeida

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Biossensor da Amilase Salivar na Monitorização de Stresse: A sua Utilidade no Campo Militar” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Paulo César Esteves dos Santos e do Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Maria de Sousa Almeida

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O Biossensor da Amilase Salivar na Monitorização de Stresse: A sua Utilidade no Campo Militar” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Paulo César Esteves dos Santos e do Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Julho 2018



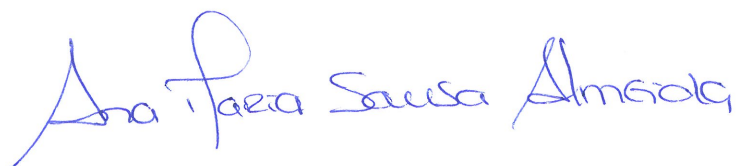
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## Declaração de Honra

Eu, Ana Maria de Sousa Almeida, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº2011161656, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “O biossensor da amilase salivar na monitorização do stresse: a sua utilidade no campo militar” 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, 11 de julho de 2018.



Ana Maria de Sousa Almeida

## **Agradecimentos**

Gostaria de dedicar esta monografia a toda a minha família, em especial à minha mãe por todo o apoio, incentivo e orgulho demonstrado.

Ao Fábio, pelo carinho incondicional e companheirismo, por ter estado sempre lá para mim e por saber, antes de mim, que eu seria capaz.

Aos meus amigos pela motivação constante e por terem acreditado sempre em mim.

Ao Professor Doutor Rui Barbosa por toda a disponibilidade e ajuda.

A toda a equipa da Sucursal de Coimbra do Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos, ao Dr.º Paulo Santos, Dr.º Vitor e Dona Celeste pela amizade e pela formação calorosa com que me receberam.

# Índice

## Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

1. INTRODUÇÃO .....	7
2. CONTEXTUALIZAÇÃO DO LABORATÓRIO MILITAR DE PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS .....	8
3. ANÁLISE SWOT .....	9
3.1 PONTOS FORTES .....	9
1. Equipa Técnica .....	9
2. Pedido, Receção e Armazenamento de Encomendas .....	10
3. Verificação de Validades, Existências e Devoluções .....	11
4. Dispensa de Dispositivos Médicos e Reagentes .....	12
5. Farmácia Pequena .....	12
6. Proximidade Farmacêutico- Utente .....	12
7. Revisão e Conferência de Receituário .....	13
8. Gestão e Dinamização do Espaço .....	14
3.2 PONTOS FRACOS .....	15
1. Aconselhamento Farmacêutico .....	15
2. Formação Deficiente em Diferentes Áreas .....	16
3. Reduzidas Ações de Formação .....	16
4. Dificuldade em Associar a Nomenclatura DCI ao Nome Comercial .....	17
5. População-Alvo Pouco Diversificada .....	17
6. Reduzida Procura de Serviços Diferenciados .....	17
7. Não Preparação de Manipulados .....	18
3.3 OPORTUNIDADES .....	18
1. Sistema Informático <i>SPharma</i> .....	18
2. Interação com Prescritores .....	19
3. Alteração da Forma e Regime de Participação .....	19
3.4 AMEAÇAS .....	20
1. Existência de dois Distribuidores Grossistas .....	20
2. Ausência de Gabinete de Utente e Acessos Insuficientes .....	20
4. CONCLUSÃO .....	21

**Parte 2: Monografia: O Bissensor da Amilase Salivar na Monitorização do Stresse: a sua Utilidade no Campo Militar**

RESUMO .....	24
ABSTRAT .....	25
1 INTRODUÇÃO .....	26
2 STRESSE: CONCEITOS FISIOPATOLÓGICOS.....	27
2.1 Sistema Nervoso Simpático .....	27
2.2 Hormonas do Stresse .....	28
3 ALFA-AMÍLASE SALIVAR: BIOMARCADOR DO STRESSE.....	28
3.1 Influência do Ritmo Circadiano, Sexo, Idade, Hábitos Tabágicos e Exercício Físico na Atividade da Alfa-Amilase Salivar .....	30
4 SALIVA: AMOSTRA BIOLÓGICA CONFIÁVEL .....	33
4.1 Fisiologia da Secreção Salivar e sua Composição .....	33
4.2 Regulação Neuronal .....	37
4.3 Utilidade no Diagnóstico Clínico .....	39
5 BIOSSENSOR PARA A DETEÇÃO DA ALFA-AMÍLASE SALIVAR .....	42
5.1 Dispositivo de Medição: O Seu Desenvolvimento .....	43
5.1.1 Temperatura e pH.....	43
5.1.2 Exatidão e Precisão.....	44
6 Colheita da Saliva.....	46
7 Medição da Atividade da Alfa-Amilase Salivar .....	47
8 Utilidade do Biossensor no Campo Militar .....	47
9 Conclusão.....	49
10 Bibliografia .....	50
Anexos Referentes à parte I .....	54

**Parte I: Relatório de Estágio em Farmácia  
Comunitária**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ADM** - Assistência na Doença aos Militares

**CSMC** - Centro de Saúde Militar de Coimbra

**DCI** - Denominação Comum Internacional

**DFA** - Deficientes das Forças Armadas

**FC** - Farmácia Comunitária

**FH** - Farmácia Hospitalar

**GNR** - Guarda Nacional Republicana

**IASFA** - Instituto de Ação Social das Forças Armadas

**LAC** - Laboratório de Análises Clínicas

**LMPQF** - Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos

**LMPQF-Suc.Coimbra** - Sucursal de Coimbra do Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos

**LOE** - Lei do Orçamento de Estado

**MNSRM** - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

**MSRM** - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

**PCHP** - Produtos de Cosmética e Higiene Pessoal

**PSP** - Polícia de Segurança Pública

**PVP** - Preço de Venda ao Público

**SAD** - Serviços de Assistência na Doença

**SNS** - Serviço Nacional de Saúde

**SWOT** - Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças (do inglês “*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, and Threats*”)



## I. INTRODUÇÃO

Conforme o exposto na Diretiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de Novembro de 2013 (Artº 44º, nº2), o título de formação de farmacêutico abrange uma formação de, pelo menos, 5 anos, dos quais 4 anos de formação teórica e prática, a tempo inteiro, finalizando com um estágio de seis meses em farmácia aberta ao público.

Apesar do estágio curricular em Farmácia Comunitária se tratar de uma obrigatoriedade legal, trata-se também de uma oportunidade única para os alunos. Com efeito, para além de permitir uma consolidação de conhecimentos e competências técnico-científicas adquiridos ao longo de todo o percurso académico, permite fazer a ponte entre a vida académica e a realidade da vida profissional.

No âmbito do Estágio Curricular está previsto a elaboração de um relatório e atendendo aos critérios definidos nas Normas Orientadoras de Estágio Curricular do MICF, o mesmo refere-se aos conhecimentos adquiridos e atividades por mim desenvolvidas bem como todos os desafios e obstáculos por mim ultrapassados com o decorrer do estágio, tendo sempre em consideração a integração da aprendizagem teórica em contexto simulado na prática profissional como também a adequação do MICF às perspetivas profissionais futuras.

O presente relatório encontra-se sob a forma de uma análise SWOT que abrange duas áreas: a interna- Pontos Fortes (*Strengths*) e Pontos Fracos (*Weakness*); a externa- Oportunidades (*Opportunities*) e Ameaças (*Threats*). Estas dimensões serão por mim abordadas, sendo minha intenção assinalar, de forma crítica, todas as observações que no meu entender enaltecem o meu estágio.

O estágio por mim realizado decorreu na Sucursal de Coimbra do Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos (LMPQF-Suc.Coimbra), tendo tido início no dia 8 de Janeiro de 2018 até dia 8 de junho de 2018. Sob a admirável orientação do Dr. Paulo César Esteves dos Santos e restante equipa.

## 2. CONTEXTUALIZAÇÃO DO LABORATÓRIO MILITAR DE PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS

A iniciação do LMPQF remonta a 16 de fevereiro de 1918, tendo na altura a designação de Farmácia Central do Exército. Este estabelecimento militar farmacêutico surgiu após o regresso de Farmacêuticos militares que exerceram a sua função nos hospitais da Flandres durante a Primeira Guerra Mundial, os quais se depararam com escasso reabastecimento de medicamentos e material sanitário dificultando assim a sua missão. Essa realidade veio demonstrar que sem uma unidade de logística farmacêutica as ações sanitárias na frente de combate seriam ineficazes pondo em risco a vida dos militares <sup>1</sup>.

Desde então, o país passou a dispor de uma estrutura logístico-farmacêutica que, adaptando-se à evolução do exército e das ciências e técnicas farmacêuticas, perdura até hoje, desempenhando a sua missão, desde 1947, com a designação de Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos.

Atualmente, a sede do LMPQF está localizada na freguesia de Olivais em Lisboa. O mesmo possui igualmente sete sucursais implementadas no Porto, Coimbra, Santa-Margarida, Olivais, Lumiar, Oeiras e Évora, as quais se encontram geograficamente situadas junto das principais Unidades de Saúde Militar e desempenhando a sua missão em várias áreas, tais como:

- Área Operacional: Apoio Logístico, Reserva Estratégica, Cooperação Técnico-Militar, Ações de Sanitarismo, Análises Clínicas, Produção de Antídotos, Medicamentos e outros produtos de Saúde;
- ID&D: Núcleo de Estudos Científicos, BIG (Biobanco de Identificação Genética), CINAMIL, Apoio a Projetos Científicos em regime de coparticipação, Sessões Científicas;
- Formação: Quadros Militares, Estágios;
- Área Assistencial: Apoio Farmacêutico à Família Militar, Apoio aos DFAs <sup>2</sup>.

O LMPQF-Suc.Coimbra encontra-se localizado na Rua Vandelli, inserida no perímetro do CSMC mas sendo uma unidade totalmente independente deste. O seu horário de funcionamento é das 8:30-13:00 e das 14:00-18:00, e procede à dispensa de medicamentos, dispositivos médicos e serviços farmacêuticos a utentes de três grupos (e respetivos familiares): Membros das Forças Armadas (ADM-IASFA), militares da GNR (SAD-GNR) e agentes da PSP (SAD-PSP). Dentro da ADM existe ainda um regime especial destinado aos Deficientes das Forças Armadas (ADM-Especial) <sup>3</sup>, estes utentes beneficiam, mediante a

apresentação de receita médica, de uma comparticipação a cem por cento em todos os medicamentos e dispositivos médicos.

**Pessoal:**

**Tabela 1:** Recursos humanos do LMPQF-Suc.Coimbra.

<b>Dr. Paulo César Santos</b>	Major-Farmacêutico	Diretor Técnico
<b>Dr. Vítor Rodrigues</b>	Civil	Farmacêutico
<b>Jorge Ferreira</b>	1º Sargento	Técnico de Farmácia
<b>Micael Ribeiro</b>	1º Cabo	Auxiliar de Farmácia
<b>Maria Celeste Castilho</b>	Civil	Assistente Técnica

### 3. ANÁLISE SWOT

#### 3.1 PONTOS FORTES

##### 1. Equipa Técnica

A excepcional equipa do LMPQF-Suc.Coimbra foi, sem dúvida alguma, o que mais contribuiu para o sucesso do meu estágio curricular por isso tenho que destacar estas excelentes pessoas como um ponto forte. Pois foram decisivas para a minha aprendizagem diária e desenvolvimento enquanto pessoa e enquanto futura profissional de saúde. A minha integração nesta equipa foi extremamente rápida pois já conhecia todos os elementos devido à minha antiga experiência profissional como militar no CSMC e por ter já realizado lá um estágio de verão. É uma equipa pequena mas muito dinâmica, organizada, com admirável sentido de trabalho e responsabilidade, estando sempre disponível a ajudar e formar os seus estagiários. Durante todo o meu estágio reinou um bom ambiente de trabalho e espírito de família o que considero fulcral para uma aprendizagem mais eficaz. Não posso também deixar de referir a excelente relação com as minhas colegas estagiárias e o quanto foi importante esta relação de entreaajuda, principalmente no início do meu estágio, onde predomina a falta de confiança e o medo de errar.

## 2. Pedido, Receção e Armazenamento de Encomendas

Foi no *back-office* que iniciei o meu estágio, onde aprendi diversos procedimentos tais como a realização de pedido de encomendas, a sua receção e armazenamento dos produtos.

Pelo facto do LMPQF-Suc.Coimbra se tratar de uma entidade pública, cada compra realizada deve, de acordo com a Lei dos Compromissos e Pagamentos em atraso (LCPA) <sup>4</sup>, ser acompanhada de um número de cabimento/compromisso como garantia da disponibilidade de fundos para a realização de despesas. Assim sempre que é necessário fazer algum pedido de encomenda, este deve ser requerido à sede, mencionando o fornecedor e os valores em causa. Só após receber o cabimento/compromisso o pedido de encomenda pode ser enviado para o fornecedor. Este procedimento é realizado sempre da mesma forma, com a exceção dos pedidos feitos à COOPROFAR e Empifarma.

O LMPQF-Suc.Coimbra apenas trabalha com dois distribuidores grossistas de medicamentos, sendo a COOPROFAR o fornecedor principal e apenas em casos excepcionais, como por exemplo, quando um produto se encontra esgotado, o pedido é então feito à Empifarma por telefone. O pedido de encomenda de medicamentos e/ou produtos de saúde à COOPROFAR (Anexo I) é feito diariamente, ao final do dia, através do sistema informático *Spharm*, tendo em conta os pedidos de reserva e o *stock* existente. Desta forma, tendo em vista facilitar o procedimento do pedido de cabimento/compromisso aos armazenistas, por uma razão de facilitar, este é feito à sede tendo por base a estimativa do valor que será necessário para as compras durante um mês, simplificando e agilizando o processo não sendo necessário fazer pedidos diários.

Relativamente à receção de encomendas, quando se trata de uma encomenda proveniente da COOPROFAR a sua receção é feita diariamente, da parte da manhã e uma vez por dia, vinda sempre acompanhada com a fatura, sendo possível fazer a receção dos produtos. Por outro lado, alguns fornecedores enviam a guia de remessa junto dos produtos. Nesses casos a sua receção só é realizada quando for rececionada a fatura.

Na presença da fatura o primeiro passo é o cálculo do PVP para os MNSRM e restantes produtos, seguindo fórmulas pré-estabelecidas, estes cálculos têm em consideração diversos fatores designadamente: venda ao balcão ou venda à FH e ainda tem ainda em conta o tipo de produto (dispositivos médicos, reagentes para o LAC, medicamentos) variando assim as margens. Seguidamente os produtos são rececionados, com verificação quantitativa e quantitativa dos produtos sendo os MNSRM devidamente etiquetados. No final são

arquivados os documentos gerados (receção de encomenda (Anexo 2)) juntamente com a fatura, ficando uma cópia no LMPQF-Suc.Coimbra e os originais enviados para a sede em Lisboa.

No LMPQF-Suc.Coimbra, os produtos são armazenados de forma lógica e intuitiva para que na hora do atendimento a procura dos medicamentos seja o mais rápido e fácil possível. Os MSRM são armazenados numa sala interior da farmácia, em gavetas, por ordem alfabética segundo a regra “*first expired, first out*” para permitir que se aviem primeiramente os medicamentos com prazo de validade mais curto. Nesta sala estão também armazenados os dispositivos médicos dentro de armários apropriados. Os medicamentos com condições especiais de armazenamento, os quais são colocados num frigorífico entre os 2°C-8°C, e os medicamentos psicotrópicos armazenados numa gaveta, à parte, juntamente com um documento de registo de entradas, saídas e *stock*.

Os MNSRM são armazenados na zona de atendimento, também por ordem alfabética em armários visíveis aos utentes bem como os produtos de veterinária, suplementos alimentares e PCHP.

Considero todos estes procedimentos um ponto forte do meu estágio pois permitiu familiarizar-me com cartonagens, nomes comerciais, saber onde se localizavam os produtos, especificidades essas que me ajudaram numa fase mais tardia do meu estágio, a prestar um melhor esclarecimento e atendimento mais rápido aos utentes.

### **3. Verificação de Validades, Existências e Devoluções**

Outras atividades que realizei no *back office* foi a verificação dos prazos de validade. Este procedimento é realizado mensalmente e são verificados todos os produtos existentes em *stock* de forma a garantir que nenhum produto se encontre fora do prazo de validade, aproveitando-se também para a verificação das existências e correta verificação da arrumação e adequado armazenamento. Considero esta atividade de uma vital importância pois além de garantir a segurança e qualidade dos medicamentos, salvaguardando a saúde dos utentes, também permite uma boa gestão dos *stocks*.

O procedimento instalado no LMPQF-Suc.Coimbra é a colocação em quarentena todos os produtos que cujo prazo de validade termine no prazo de três meses, com posterior devolução ao fornecedor. A devolução dos produtos é feita através de uma nota de devolução (Anexo 3), podendo haver várias razões para o fazer: Prazo validade curto,

embalagem danificada, produto trocado ou pedido por engano. Não posso deixar de considerar que estes procedimentos um ponto forte no meu estágio, além do que referi acima, foi possível constatar, ao longo do estágio, que uma boa gestão de *stocks* é fundamental, sendo uma base sólida para o bom funcionamento de uma farmácia.

#### **4. Dispensa de Dispositivos Médicos e Reagentes**

O LMPQF-Suc.Coimbra além da comunidade também aprovisiona a Farmácia Hospitalar do CSMC em dois grandes grupos: medicamentos e material médico-farmacêutico (Dispositivos médicos) -que por sua vez seguem para os diferentes serviços do CSMC; e o Laboratório de Análises do CSMC em reagentes e *Kits*. Considero este facto uma mais-valia no meu estágio pois permitiu-me contactar com uma grande variedade de dispositivos médicos que nunca contactara e desconhecia por completo. Aqui verifiquei uma enorme lacuna de conhecimentos nesta área, por isso, na minha opinião a unidade curricular de Dispositivos Médicos deveria ser de carácter obrigatório, pois este tema nunca foi abordado em nenhuma unidade curricular ao longo do nosso curso e na realidade de uma farmácia contactamos com uma variedade de dispositivos para os quais não temos qualquer conhecimento.

#### **5. Farmácia Pequena**

Com já referi, o LMPQF-Suc.Coimbra procede à dispensa de medicamentos, dispositivos médicos e serviços farmacêuticos a utentes de três grupos e respetivos familiares (ADM, GNR, PSP). Devido a esta especificidade e em comparação com outras farmácias de grandes dimensões, esta farmácia tem um movimento mais reduzido.

Identifico este aspeto um ponto forte no meu estágio, pois permitiu-me aprender com mais calma, além de possibilitar um atendimento mais cuidado e personalizado a cada utente, exercendo assim o meu papel como futura farmacêutica com mais atenção, profissionalismo, evitando erros e possibilitando que os utentes se sintam satisfeitos e esclarecidos.

#### **6. Proximidade Farmacêutico-Utente**

O farmacêutico apesar de ser o especialista do medicamento, na farmácia, este deve centrar toda a sua atenção no utente que o procura. A farmácia é uma área de profunda exigência, que obriga a uma contínua formação e adaptação pessoal, sendo essencial reconhecer o tipo

de utente com que nos deparamos por forma a adaptar o tipo de atendimento e aconselhamento como também a linguagem para uma correta compreensão e transmissão da informação.

Pela comunidade específica que o LMPQF-Suc.Coimbra serve, a grande maioria dos utentes são habituais, este facto permitiu, com o decorrer do estágio, conhecer algumas das suas características e adaptar a minha forma de diálogo a eles, conseguindo até estabelecer relações de proximidade com parte dos utentes de maior assiduidade, sentindo que os utentes confiavam no meu aconselhamento e compreendiam as informações por mim dadas.

## **7. Revisão e Conferência de Receituário**

Ao longo do estágio tive a possibilidade de dispensar medicamentos através de receitas manuais, receitas informatizadas aviadas por via manual (tipo 01-Normal e tipo 02-Renováveis 1°,2°e3°via) e ainda receitas eletrónicas. Não deixando de salientar que estas últimas apresentam vantagens tanto sob o ponto de vista do utente como do ponto de vista do farmacêutico. As receitas manuais, por sua vez, obriga a uma maior atenção havendo sempre a necessidade de conferir vários aspetos tais como: cabeçalho bem preenchido (nome do utente e número de beneficiário), vinheta do médico e sua assinatura, validade da receita, carimbo do local de prescrição.

A revisão e conferência de receituário trata-se de uma tarefa imprescindível para uma boa gestão e organização de qualquer farmácia pois permite a deteção de eventuais erros durante o atendimento, diminuindo assim a probabilidade das receitas serem devolvidas resultando em perdas financeiras pela não participação das respetivas entidades.

No LMPQF-Suc.Coimbra cabe à parte administrativa esta função no entanto tive a oportunidade de intervir na realização desta tarefa algumas vezes. No respeito às receitas eletrónicas após aviamento ao balcão as mesmas são automaticamente enviadas para o Centro de Conferência de Faturas, em relação as receitas manuais após a sua dispensa ao balcão, estas eram recolhidas ao longo do dia onde se seguia uma segunda conferência ao verso da receita de modo a detetar possíveis erros. Era verificado se a faturação da receita foi feita à entidade correspondente, se o número e lote da mesma se encontravam corretos, se a assinatura do utente se encontrava no local apropriado e ainda se estava devidamente assinada e datada pelo farmacêutico responsável pela cedência. Depois estas eram separadas pelas diferentes entidades de participação e organizadas por lotes e por número de

receita (do número 1 ao número 30). Ao final de cada mês procedia-se ao fecho dos lotes e anexados a estes o respetivo verbete de identificação para posterior envio às entidades competentes. Pelo facto de uma grande percentagem das receitas que nos chegavam no LMPQF-Suc.Coimbra serem receitas manuais, esta atividade permitiu-me estar mais atenta a todas as especificidades que envolvem a cedência deste tipo de receituário, minimizando assim a possibilidade de ocorrência de erros.

## **8. Gestão e Dinamização do Espaço**

O LMPQF-Suc.Coimbra encontra-se subdividido em diversas áreas:

- Sala de atendimento com dois postos de atendimento;
- Sala dos serviços administrativos e financeiros;
- Sala de receção de encomendas e armazenamento;
- Vestiário;
- Instalações sanitárias;
- Zona de descanso do pessoal.

Relativamente à sala de atendimento esta tem um espaço físico reduzido mas no meu entender adequado à afluência dos utentes. No entanto esta é desprovida de lineares e gôndolas contendo apenas atrás do balcão de atendimento armários expositores onde estão colocados os produtos de venda livre impossibilitando assim a aplicação de algumas técnicas de *merchandising* e publicidade dos produtos. Cientes desta realidade a equipa do LMPQF-Suc.Coimbra têm como prática recorrente a alteração da disposição dos produtos, no sentido de promover a sua rotatividade e permitindo aos utentes verificar a variedade dos produtos existentes. Não posso de deixar de considerar este ponto com um ponto forte no meu estágio pois foi-me permitido, por diversas vezes, participar ativamente neste contexto, pondo em prática os saberes adquiridos nas unidades curriculares “ Organização e Gestão Farmacêutica”, “Comunicação e Marketing Farmacêutico” e explorar a minha capacidade de tirar o melhor partido possível do espaço adaptando-o de acordo com as necessidades dos utentes e adequando-o à atualidade e realidade.



## 3.2 PONTOS FRACOS

### I. Aconselhamento Farmacêutico

Com o decorrer do meu estágio foi-me possível realizar diversas tarefas, tanto de *back-office* como de *front-office*. Nas primeiras semanas de estágio, e após já estar inteirada de uma forma geral dos procedimentos a realizar em *back-office*, tanto eu como a minha colega estagiária começamos por assistir aos atendimentos realizados, tendo como propósito principal o contacto com a realidade do atendimento e a sua dinâmica, como também a perceção de todos os passos a realizar num atendimento de qualidade. Foi aqui que tomei consciência do que o dia-a-dia de uma farmácia exige, os conhecimentos aprofundados e domínio de tudo o que envolve o medicamento são nos constantemente postos à prova por utentes cada vez mais exigentes e informados.

Quando era questionada acerca dos MNSRM, sobre quais eram os mais indicados para determinada situação, as suas posologias e tudo o que engloba o seu aconselhamento foi sem dúvida onde senti mais dificuldade, principalmente numa fase inicial do estágio onde me sentia bastante insegura em relação aos meus conhecimentos e com receio constante de errar, tendo a necessidade em muitas vezes de interromper o atendimento dos meus colegas para tirar dúvidas. Considero, portanto este aspeto um ponto fraco no meu estágio, não podendo de deixar de apontar o facto, de na atual estruturação do MICF, os conhecimentos transmitidos no âmbito da indicação terapêutica, são dados de uma forma geral, muito por culpa, na minha opinião, da fusão das unidades curriculares “Intervenção Farmacêutica em Auto-Cuidados de Saúde” e “Fitoterapia” onde os seus conteúdos foram lecionados de forma muito compacta, acrescendo o facto desta unidade curricular compor o primeiro semestre do quinto ano o qual tem uma duração menor.

Entendo que esta situação deveria ser alterada e melhorada, pois é no esclarecimento de dúvidas, na transmissão de saberes e informações uteis aos utentes que está a diferenciação do farmacêutico em relação aos outros profissionais de saúde. No entanto não posso deixar de referir que esta insegurança foi desaparecendo ao longo dos meus seis meses de estágio, sendo que no final já realizava aconselhamentos de forma autónoma.

## **2. Formação Deficiente em Diferentes Áreas**

Ao longo do estágio verifiquei que possuía escassos conhecimentos relativamente a algumas áreas, refletindo-se negativamente no meu desempenho. Entre elas destacam-se as áreas de dermocosmética, produtos de veterinária, suplementos alimentares e puericultura.

Considero este aspeto um ponto fraco no meu estágio pois sempre que eram solicitados, pelos utentes, algum produto dentro destas áreas, senti grande dificuldade e insegurança no aconselhamento dos mesmos tendo sido quase sempre necessário requerer ajuda para responder às solicitações.

Algumas destas limitações poderiam, na minha opinião, ter sido superadas através de uma formação académica mais prática e aplicada à realidade da FC, acreditando que deveria existir algumas alterações, nomeadamente nas unidades curriculares “Dermofarmácia e Cosmética” e “Preparações de uso veterinário” onde a componente pratica deveria ser melhor explorada capacitando os alunos para o mercado de trabalho.

Juntando a isso o LMPQF-Suc.Coimbra não disponibiliza de uma vasta área de produtos de dermocosmética, produtos de veterinária, suplementos alimentares, higiene oral e puericultura, muito por culpa da especificidade do público-alvo que serve como também pela sua reduzida procura, limitando assim a minha aprendizagem pela impossibilidade de contactar com a variedade de produtos existentes no mercado. Apesar de não ter ficando tão familiarizada como gostaria com esses produtos, ainda assim, consegui entender melhor as funções e aplicações dos vários produtos, tendo-se tornado mais fácil o aconselhamento destes com o decorrer do estágio.

## **3. Reduzidas Ações de Formação**

Sendo que o farmacêutico necessita de uma contínua aprendizagem, uma formação complementar é essencial para a aquisição de novos conhecimentos e aprofundamento de conhecimentos já adquiridos dotando o farmacêutico de saberes atualizados, específicos e direcionados, melhorando e por sua vez facilitar o seu aconselhamento aos utentes. Infelizmente, ao longo do estágio não surgiu a oportunidade de realizar ações de formação, nomeadamente, por parte dos diferentes laboratórios. Considero este aspeto um ponto fraco no meu estágio pois decerto este tipo de ações teria enriquecido o meu estágio e por sua vez permitir um melhor aconselhamento aos utentes, e possivelmente preencher lacunas nos meus conhecimentos em áreas já mencionadas anteriormente. Mas não posso deixar de

referir que os conhecimentos que me foram transmitidos pela equipa do LMPQF-Suc.Coimbra contribuíram para que, progressivamente, me sentisse mais confiante no atendimento e transmissão de conhecimentos aos utentes.

#### **4. Dificuldade em Associar a Nomenclatura DCI ao Nome Comercial**

A dificuldade em associar o nome comercial de medicamentos à sua substância ativa foi dos aspetos em que, enquanto estagiária, senti mais dificuldade. Frequentemente era questionada por parte dos utentes, acerca de medicamentos aos quais se referiam com o nome comercial e por diversas vezes tive a necessidade de recorrer ao sistema informático *SPharm* ou pedir ajuda para ser possível esclarecer as dúvidas colocadas. Outra situação que também ocorria com frequência era a de os utentes não conseguirem indicar corretamente o nome comercial do medicamento, sendo para mim difícil perceber e fazer a associação sentindo-me muitas vezes envergonhada por não saber.

Ao longo do percurso académico vamos contactando com a nomenclatura DCI não estando tão familiarizados para os seus nomes comerciais, portanto seria importante, em algumas unidades curriculares haver uma maior referências aos nomes comerciais. Contudo não considero que esta minha dificuldade seja devida a uma má formação académica, pelo contrário, pois tenho a plena consciência que este conhecimento será adquirido com o tempo e com a experiência.

#### **5. População-Alvo Pouco Diversificada**

Pela especificidade já referida, a maioria dos utentes que frequentam o LMPQF-Suc.Coimbra são utentes do CSMC sendo maioritariamente idosos e aposentados. Apesar de considerar este aspeto positivo no meu estágio pois permitiu estabelecer uma relação de proximidade, no entanto esta população não é heterogénea, impossibilitando o contacto com outras faixas etárias e conseqüentemente as questões e dúvidas que daí poderiam advir. Considerando assim um ponto fraco no meu estágio, pois não fui posta à prova nesse aspeto.

#### **6. Reduzida Procura de Serviços Diferenciados**

O LMPQF-Suc.Coimbra tem à disponibilidade dos seus utentes, serviços tais como a medição da pressão arterial, glicémia, colesterol e triglicéridos mas devido à sua inserção no perímetro do CSMC não existe uma elevada procura por estes serviços, tendo durante todo

o meu estágio apenas realizado estes atos duas vezes (medição da pressão arterial e glicémia). Considero este facto um ponto fraco no meu estágio, pois creio no importantíssimo papel do farmacêutico neste sector não só pela possibilidade de detetar anormalidades como também pela transmissão dos melhores conselhos aos utentes no sentido de os ajudar a controlar os seus parâmetros resultando, assim, na melhoria da sua saúde.

## **7. Não Preparação de Manipulados**

Por o LMPQF-Suc.Coimbra não possuir instalações adequadas à preparação de manipulados, durante todo o meu estágio não tive a oportunidade de realizar manipulados e conseqüentemente a possibilidade de pôr em prática os conhecimentos adquiridos na unidade curricular de “Farmácia Galénica” refletindo-se assim num aspeto negativo do meu estágio.

### **3.3 OPORTUNIDADES**

#### **I. Sistema Informático *SPharma***

Apesar da grande maioria das farmácias utilizar o *software* Sifarma 2000® da Glintt, no LMPQF-Suc.Coimbra o sistema informático utilizado é o *SPharm* pertencente à SoftReis. Este sistema apresenta-se de uma forma bastante simples e clara com uma série de funcionalidades muito uteis, permitindo a todos os seus utilizadores executar diversas tarefas, de forma rápida e eficaz, tais como a receção, pedidos de encomendas e a dispensa de medicamentos mas também permite o acesso rápido a todas as informações acerca dos medicamentos tais como informação técnico-científica, resumo das características do medicamento, posologias, entre outros. Durante o meu estágio tive a oportunidade de explorar as várias potencialidades deste sistema, estando já na fase final do estágio bastante à vontade a executar as diferentes tarefas. Considero este ponto, uma oportunidade no meu estágio pelo contacto com um sistema informático de gestão e organização diferente do habitual.

## **2. Interação com Prescritores**

Uma vez que a grande maioria das receitas que chegam ao LMPQF-Suc.Coimbra são prescritas no CSMC qualquer imprecisão ou dúvida em relação às mesmas era possível resolver e esclarecer com relativa facilidade. Esta proximidade, a meu ver, é de uma extrema importância pois possibilita a comunicação, troca de impressões e partilha de experiências entre os diferentes profissionais de saúde sempre em prol do bem-estar e saúde dos utentes. Considero este ponto uma oportunidade, pois acredito, que na maioria das farmácias este contacto direto com os prescritores não acontece na generalidade das vezes. Não deixando de apontar o facto de pela minha antiga experiência profissional como militar do CSMC essa interação foi facilitada.

## **3. Alteração da Forma e Regime de Comparticipação**

Na fase inicial do meu estágio, durante a cedência de medicamentos ou dispositivos médicos, através de uma receita, eram usados códigos alfanuméricos que identificavam os diferentes organismos de comparticipação, onde o sistema informático assumia automaticamente o valor da comparticipação pelos diferentes subsistemas (15-ADM; 40-SAD.GNR; 50-SAD-PSP; S9-DFAs; PI-dispositivos médicos para DFAs). Porém esta prática foi modificada, pela alteração da Lei do Orçamento de Estado (LOE) de 2018, onde o art.º 197<sup>5</sup> veio introduzir uma nova realidade para a forma e regime de comparticipação dos medicamentos aos utentes das “ Farmácias Militares”. Com efeito, a comparticipação assumida anteriormente pelos subsistemas ADM e SAD’s passou a ser responsabilidade do SNS. Considero esta alteração uma oportunidade no meu estágio pois possibilitou o contacto com os diferentes regimes de pensionistas do SNS que até então desconhecia por completo. Além do referido, esta alteração acompanhou uma outra enorme vantagem. Pois por anteriormente a comparticipação não ser assumida pelo SNS, o LMPQF-Suc.Coimbra não integrava o Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Diabetes, sendo que os produtos utilizados na diabetes tais como insulina, lancetas, tirar ou aparelhos para a medição da glicémia apenas eram dispensados aos DFAs, pelo que os restantes utentes teriam que pagar na totalidade esses tipos de produtos. O mesmo se verificou com utentes que beneficiavam de um regime especial de comparticipação, onde os medicamentos eram vendidos com a comparticipação normal pelos subsistemas ADM e SAD’s, sendo vantajoso aos utentes dirigirem-se a outras farmácias. Com a alteração do art.º 197, felizmente essa realidade deixou de se verificar, daí considerar este ponto também uma oportunidade, no sentido da aproximação ao praticado

nas farmácias em geral como também permite, em última análise, a fidelização dos utentes ao LMPQF-Suc.Coimbra.

### **3.4 AMEAÇAS**

#### **1. Existência de dois Distribuidores Grossistas**

Devido à especificidade da população-alvo que o LMPQF-Suc.Coimbra serve, o *stock* que possui não é de grandes dimensões, acontecendo com alguma frequência não existir, no imediato, os medicamentos ou dispositivos médicos solicitados. Sempre que situações desse tipo ocorriam era feito o pedido aos armazenistas quer pelo sistema informático, criando uma reserva, quer por via telefónica mas ambas as situações não eram as ideais pois implicava sempre a posterior deslocação à farmácia, e muitos utentes acabavam por preferir deslocar-se a outras farmácias. O facto de ter apenas ter dois distribuidores grossistas de medicamentos é a meu ver uma ameaça no sentido em que ao longo do estágio foram várias as vezes que certos medicamentos se encontraram esgotados ou rateados não sendo possível atender a todas as solicitações e por fim a reposição de *stocks*.

#### **2. Ausência de Gabinete de Utente e Acessos Insuficientes**

Apesar de considerar que as dimensões e disposição do LMPQF-Suc.coimbra são as ideais atendendo à afluência dos utentes, como já referi anteriormente, na minha opinião uma desvantagem que apresenta refletindo-se assim numa ameaça é a inexistência de um gabinete de utente. Um dos dispositivos médicos que são requisitados com elevada frequência são meias de compressão para as quais é necessário a realização de medições, sendo que nestas situações os utentes são encaminhados para instalações pouco cómodas e impessoais podendo causar algum desconforto.

Acredito portanto que um gabinete de utente seria de extrema utilidade nestas situações como também aquando da medição de parâmetros bioquímicos ou até mesmo para um aconselhamento ao utente num ambiente mais reservado e privado. Não posso também deixar de referir que o acesso ao LMPQF-Suc.Coimbra é feito apenas por uma escadaria e uma vez que a maioria dos utentes são idosos e com algumas limitações de locomoção torna-se para estes difícil a sua deslocação, sendo mesmo inacessível para utentes em cadeira de rodas ou com mobilidade reduzida.

#### **4. CONCLUSÃO**

Sendo o plano curricular do MICF tão vasto e completo, proporciona uma formação multidisciplinar aos seus alunos preparando-os para as diversas áreas a ser desempenhadas pelo farmacêutico.

O estágio em farmácia comunitária trata-se de facto uma realidade onde é possível aplicar, consolidar e inter-relacionar todos esses saberes adquiridos ao longo do percurso académico, como também adquirir novos conhecimentos essenciais que apenas só são possíveis no contexto profissional, fazendo-nos crescer, ganhar ética de trabalho para num futuro próximo, nos tornar os melhores profissionais possíveis.

Considero que estes seis meses de estágio foram indispensáveis para a minha formação profissional, pois de facto foi possível aplicar no contexto profissional, muitos dos conhecimentos adquiridos ao longo destes anos enquanto estudante mas também foi possível desenvolver a vertente humana tão importante no exercício desta profissão.

Ao finalizar este relatório não posso de deixar de agradecer a toda a equipa do LMPQF-Suc.Coimbra pela receção tão carinhosa, fazendo-me sempre sentir como uma profissional integrante da equipa, pela disponibilidade que sempre mostrou aquando das minhas dúvidas tendo um impacto importantíssimo no meu desenvolvimento diário, salientando sempre o papel fundamental o que o farmacêutico executa na sociedade.

**Parte 2. Monografia: O Biossensor da  
Amilase Salivar na Monitorização do  
Stresse: A sua Utilidade no Campo Militar**



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ACTH** - Hormona Adrenocorticotropina

**AMPc** - Adenosina Monofosfato Cíclico

**ANS** - Sistema Nervoso Autónomo

**BSA** - Albumina Sérica Bovina

**CRH** - Hormona Libertadora da Corticotropina

**Gal-G2-CNP** - 2-cloro-4-nitrofenil-4-O-β-D-galactopiranosilmaltoside

**GRs** - Recetor de Glicocorticóides

**HPA** - Eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra-Renal

**PNS** - Sistema Nervoso Parassimpático

**PVN** - Núcleo Paraventricular

**sAA** - Alfa-Amílase Salivar

**SAM** - Sistema Simpático Adreno-Medular

**SNS** - Sistema Nervoso Simpático

**TSST** - *Trier Social Stress Test*

## RESUMO

“O Stresse está presente no quotidiano de todos nós e as suas manifestações têm vindo a receber uma atenção crescente pelos efeitos deletérios que provoca no organismo.

Vários métodos têm sido utilizados para quantificar os níveis de stresse, tais como testes psicológicos, medição da frequência cardíaca, pressão arterial, e biomarcadores na saliva e no sangue. No entanto a colheita de sangue pode se tornar inviável, pois o próprio método em si, pode provocar um aumento das hormonas de stresse levando a falsos resultados. Assim, a análise da saliva é uma alternativa adequada, pela facilidade da sua colheita, por ser não invasiva e não provocar stresse nos indivíduos. Daí o crescente interesse pela quantificação da Alfa-Amilase Salivar (sAA) como biomarcador do stresse, pois esta reflete a reação do sistema de resposta ao stresse, o Sistema Nervoso Simpático (SNS).

O recurso a biossensores para a determinação da sAA é uma mais-valia, porque são específicos e possibilitam o processamento imediato da amostra, fornecendo resultados precisos e exatos em poucos minutos, a que acresce a possibilidade de ser utilizado para automonitorização em qualquer lugar.

Estas características são convenientes na utilização do biossensor, durante treinos e operações militares, dado que este grupo de profissionais se depara constantemente com situações limite. A monitorização dos seus níveis de stresse é de grande importância no sentido de prevenir, a longo prazo, o desenvolvimento de certas patologias”.

**Palavras-chave:** Alfa-Amilase Salivar; Biomarcador de Stresse; Biossensor; Sistema Nervoso Simpático; Stresse; Treino Militar.

## **ABSTRACT**

“Stress is present in the daily life of all of us and its manifestations have been receiving increasing attention due to the deleterious effects that it causes in the organism.

A large number of methods have been used to quantify stress levels, such as psychological tests, heart rate measurement, blood pressure, and biomarkers in saliva and blood. However, blood collection may become impracticable, since the method itself may cause an increase in stress hormones leading to false results. Thus making saliva analysis a useful alternative because its sampling is not invasive and causing no stress in individuals. Hence the growing interest in the use of Salivary Alpha-Amylase (sAA) as a stress biomarker. This reflects the reaction of the stress response system, Sympathetic Nervous System (SNS).

The use of biosensors for determination of sAA represents an added value, because of its specificity allowing the immediate processing of the sample, providing, in a few minutes, precision and accuracy of results, in addition to the possibility of being used anywhere as a self-test.

These characteristics are very convenient for its use, during training and military operations, because this group of professionals are constantly faced with limit situations. The monitoring of their stress levels are essential in order to prevent, in long term, the development of a number of pathologies“.

**Key Words:** Salivary Alpha-Amylase; Stress Biomarker; Biosensor; Sympathetic Nervous System; Stress; Military Training.

## I INTRODUÇÃO

O Homem contacta diariamente com agentes e estímulos que podem induzir um estado de stresse no seu organismo. Apesar da resposta a alguns deles ser benéfica para o organismo porque permite o desenvolvimento de mecanismos de regulação e adaptação, os quais são essenciais à vida, contudo elevados níveis de exposição ao stresse ou exposição crónica a este, levam a efeitos deletérios no organismo, provocando uma desregulação neuronal, metabólica e comportamental <sup>6</sup>. Estas alterações afetam diversos órgãos resultando em patologias como hipertensão arterial, alterações do ritmo cardíaco, alterações do sistema imunitário e endócrino, entre outras<sup>7</sup>.

Os militares, pela especificidade da sua atividade profissional, em missões e cenários de combate ou em treinos militares, convivem frequentemente com situações que induzem stresse <sup>8</sup>, sendo por isso uma população de risco para o desenvolvimento de um espectro de patologias, dentro das quais algumas referidas anteriormente.

Na presente monografia aborda-se a fisiologia da resposta a estímulos indutores de stresse, a qual é determinada pelo eixo Hipotálamo-Hipófise-Supra-Renal (HPA) e pelo Sistema Nervoso Simpático (SNS)<sup>9</sup>, e a utilização da Alfa-Amilase Salivar (sAA) como biomarcador de stresse. Em vários estudos anteriormente realizados, tanto em Humanos como em animais, foi possível concluir que o SNS desempenha um papel fulcral na secreção da sAA, com contribuições dos mecanismos  $\alpha$ -adrenérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos sugerindo que a sAA pode ser considerada um bom indicador de stresse físico e psicológico <sup>10</sup>.

Além disso, é descrita a monitorização da sAA através biossensores utilizados em dispositivos portáteis, que apresentam características de desempenho (e.g. sensibilidade, precisão e exatidão) similares aos autoanalisadores clínicos encontrados em laboratórios de análises clínicas, com a vantagem de poderem ser utilizados em automonitorização, com especial destaque em situações de treino militar.

## 2 STRESSE: CONCEITOS FISIOPATOLÓGICOS

### 2.1 Sistema Nervoso Simpático

Por stresse entende-se todo o processo ou série de processos que envolvem a percepção, avaliação de eventos ou estímulos nocivos, ameaçadores ou desafiadores que alterem a homeostasia, sendo necessária uma resposta adaptativa do organismo que leve à sua recuperação <sup>11</sup>.

Os estímulos que induzem stresse evocam respostas endócrinas, autonómicas e comportamentais complexas e específicas do tipo, da natureza e intensidade dos agentes <sup>12</sup>. Podemos classificar em dois tipos os agentes causadores de stresse, os quais podem ser emocionais/psicológicos, de que são exemplos os problemas interpessoais, luto, desemprego, ou fisiológicos, como exemplo, fome, privação do sono, doenças crónicas, entre outros<sup>11</sup>.

A resposta fisiológica, aos estímulos e agentes que induzem stresse, é determinada pelo eixo HPA e pelo SNS. A resposta do eixo HPA compreende uma cascata de produção de hormonas que termina com a libertação do cortisol na corrente sanguínea, sendo esta resposta mais longa, em contraste com a resposta simpática que é imediata <sup>9</sup>.

Para qualquer tipo de agressão, a reação primária consiste na ativação do SNS por ativação das células cromafins da medula supra-renal, que leva à produção de catecolaminas (noradrenalina e adrenalina) atingindo valores de concentração plasmática três a quatro vezes superiores aos encontrados em condições basais<sup>13</sup>. Os impulsos nervosos com aferências provenientes quer de recetores visuais, auditivos, térmicos ou de pressão, ativam os neurónios terminais simpáticos na medula adrenal que levam à secreção de adrenalina (80%) e noradrenalina (20%)<sup>13</sup>. A adrenalina desempenha um papel fundamental, o qual prende-se com o suporte básico de vida, contrariando um estado hipoglicémico pela disponibilização de energia a partir de reservas e aumentando a pressão arterial e o débito cardíaco. Desta forma o organismo é preparado em termos de adaptação metabólica, endócrina, cardiovascular e respiratória, para uma reação imediata de luta ou fuga (do inglês *fight or flight*) <sup>13</sup>.

## 2.2 Hormonas do Stresse

O cérebro é o principal órgão de resposta ao stresse e sua adaptação, dado que reconhece as ameaças e estabelece as respostas comportamentais e fisiológicas aos agentes e estímulos que induzem stresse <sup>14</sup>. Por sua vez, o eixo HPA é ativado através dos sinais estimulatórios que chegam ao núcleo paraventricular (PVN) no hipotálamo. O hipotálamo envia projeções axonais para o sistema porta-hipofisário, que após ativação, libertam a CRH e a vasopressina, as quais vão atuar na hipófise anterior, promovendo a síntese e libertação da Hormona Adrenocorticotropina (ACTH). Os níveis circulantes da ACTH atuam na zona fasciculada do córtex da glândula supra-renal promovendo a síntese e libertação de glicocorticóides, sendo o cortisol o principal glicocorticóide endógeno <sup>15</sup>.

Assim, na presença de uma ameaça física ou psicológica, os níveis de cortisol aumentam para disponibilizar energia (pela estimulação de gliconeogénese, proteólise, glicogenólise e lipólise) necessária ao organismo para recuperar a homeostasia <sup>6</sup>, e permitir a sobrevivência. No entanto a exposição a elevados níveis de stresse ou uma exposição crónica provocam efeitos deletérios para o organismo, devido a uma disfunção do cortisol, levando a uma desregulação metabólica e imunológica perdendo o organismo a capacidade de se manter dentro do intervalo de equilíbrio<sup>11</sup>.

No entanto, pode ocorrer uma diminuição da resposta do eixo HPA após estimulação crónica com o mesmo estímulo. Na resposta ao stresse agudo, além dos aumentos das hormonas CRH, ACTH e cortisol, os recetores glicocorticóides (GRs) são fortemente ativados, contudo durante a secreção prolongada ou excessiva do cortisol, pensa-se que pode ocorrer uma dessensibilização (*dow-regulation*) compensatória por diminuição da sensibilidade dos GRs à ligação do cortisol <sup>6</sup>.

Esta adaptação fisiológica ao stresse, contudo, nem sempre é conseguida, pois é função de uma história prévia de stresse que fornece uma plasticidade individual na forma de resposta a um novo agente agressor<sup>13</sup>.

## 3 ALFA-AMÍLASE SALIVAR: BIOMARCADOR DO STRESSE

A Alfa-Amilase Salivar (sAA) é uma metaloenzima que contém cálcio no seu centro ativo e que catalisa a hidrólise do amido, nas ligações  $\alpha$ -1,4, em glicose e maltose<sup>10</sup>. A sAA é produzida e excretada localmente pelas células acinares das glândulas salivares em resposta à

estimulação simpática pela noradrenalina <sup>9</sup>. Entre 40% a 50% da proteína total produzida pelas diferentes glândulas corresponde à sAA e dentro deste intervalo, cerca de 80% é produzida pelas glândulas parótidas e 20% pelas submandibulares <sup>10,16</sup>.

Em vários estudos anteriormente realizados, tanto em Humanos como em animais, foi possível concluir que o SNS desempenha um papel fulcral na secreção da sAA, com contribuições dos mecanismos  $\alpha$ -adrenérgicos e  $\beta$ -adrenérgicos sugerindo que a sAA pode ser considerada um biomarcador de stresse físico e psicológico <sup>10</sup>.

Enquanto a avaliação do cortisol livre na saliva já se mostrou útil para avaliar o funcionamento e reatividade do eixo HPA, a sAA é o biomarcador candidato para avaliar a atividade do sistema simpático adreno-medular (SAM) <sup>17</sup>.

Estes resultados foram confirmados em vários estudos, um deles desenvolvido por Van Stegeren *et al.*,<sup>18</sup> onde foram testados os efeitos do uso de fármacos  $\beta$ -bloqueadores (e.g. propranolol) sobre a atividade da sAA em indivíduos sujeitos a um teste de stresse psicológico padronizado (Trier Social Stress Test ou TSST). O grupo controlo mostrou um elevado aumento da sAA após a realização dos referidos testes de stresse enquanto no grupo ao qual foi administrado propranolol a resposta da sAA foi atenuada pela inibição do SNS.

No estudo desenvolvido por Nater *et al.*,<sup>17</sup> vinte e quatro adultos saudáveis foram expostos ao TSST e posteriormente a condições de repouso, onde foram medidos os níveis de cortisol e sAA. Os resultados obtidos indicam que em ambos, a sAA e o cortisol, sofreram aumentos dependentes do stresse provocado pela realização do TSST, no entanto, não foi encontrada uma correlação entre as curvas de resposta da sAA e do cortisol.

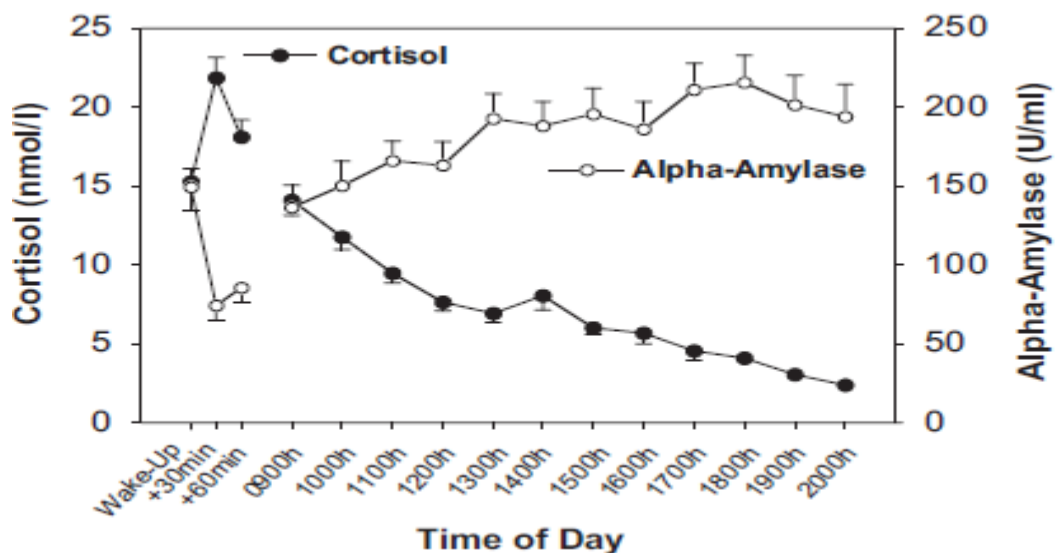
Estes resultados sugerem que a atividade da sAA reflete a reação de um sistema de resposta ao stresse diferente do eixo HPA, ou seja, reflete a resposta do SNS <sup>17</sup>. Portanto, a sAA pode ser considerada como um biomarcador de stresse e dos mecanismos fisiológicos provocadas no organismo quando este se encontra sob estímulos indutores de stresse<sup>10</sup>.

### 3.1 Influência do Ritmo Circadiano, Sexo, Idade, Hábitos Tabágicos e Exercício Físico na Atividade da Alfa-Amilase Salivar

#### *Influência do ritmo circadiano*

A secreção hormonal está sujeita a variações em função do ritmo circadiano, e também o próprio fluxo salivar e a excreção de proteínas salivares<sup>16</sup>.

Em estudos anteriores, que avaliaram a variação diurna da sAA, a grande maioria dos resultados indicam que os níveis de sAA variam de acordo com o ritmo circadiano apresentando níveis mais baixos durante a parte da manhã e atingindo um pico ao longo da tarde <sup>16</sup> <sup>19</sup>. No entanto, a amostragem foi feita sem periodicidade bem definida (as amostras foram obtidas apenas 4-5 vezes num período de doze horas), e os procedimentos realizados em ambiente de laboratório centralizado, ele próprio indutor de stress <sup>19</sup>.



**Figura 1:** Curso diurno da atividade da sAA e concentrações diárias do cortisol. Gráfico retirado da ref<sup>a</sup> 19

Nater *et al.*, <sup>19</sup> desenvolveu o primeiro estudo em que avaliou o perfil diário da sAA, recolhendo amostras de hora a hora, fora do contexto laboratorial e tendo em conta algumas variáveis que poderiam influenciar a atividade da sAA. No estudo foram determinados os níveis da sAA em 76 indivíduos, as amostras foram recolhidas tendo em conta o ritmo circadiano individual (ao despertar, 30 e 60 min após o despertar e depois hora a hora entre as 9:00 e as 20:00) enquanto os seus participantes desenvolviam as suas rotinas diárias. Com este estudo foi possível demonstrar que os níveis da sAA apresentam



uma forte dependência do ritmo circadiano, com uma diminuição pronunciada nos primeiros 30 minutos após acordar e níveis crescentes durante a tarde e a noite.

A grande maioria dos estudos apenas avaliou a atividade da sAA em resposta a situações de stresse agudo, em contraste poucos são os estudos que relacionam a sua atividade sob situações de stresse crónico<sup>10</sup>.

O estudo realizado por Nater *et al.*, também relacionou a atividade da sAA em condições de stresse crónico, tendo os resultados mostrado que os indivíduos sujeitos a situações de stresse crónico relativamente intenso tinham níveis diários da sAA mais elevados quando comparados com indivíduos sujeitos a baixos níveis de stresse crónico<sup>10,19</sup>.

Para usar a sAA como um biomarcador do stresse, é crucial estabelecer seu padrão diurno, bem como os determinantes que possam influenciar esse padrão. Esta informação permitirá aos investigadores escolher a hora correta do dia para estudos de stresse agudo, e escolher uma estratégia de amostragem apropriada em estudos que investigam condições psicossociais crônicas<sup>19</sup>.

#### *Influência do sexo*

O SNS é distinto entre ambos os sexos e por isso é expectável que a atividade basal da sAA e as respostas ao stresse também sejam influenciadas pelo sexo<sup>16</sup>.

A maioria dos estudos que envolvem a sAA avaliam geralmente o seu ritmo diurno bem como a sua resposta perante situações agudas de stresse, e raramente se focam nos determinantes (idade, sexo, hábitos tabágicos e exercício físico) que influenciam a sua atividade, como por exemplo, o impacto de ambos os sexos na atividade da sAA. No entanto, os resultados sugerem que não existem diferenças significativas entre homens e mulheres, no padrão diurno da sAA, sendo os níveis basais semelhantes tanto nos homens quanto nas mulheres<sup>16,19</sup>. Outro aspeto importante a ter em atenção é se os níveis da sAA têm idêntica variação entre homens e mulheres quando sujeitos a estímulos agudos que induzem stresse<sup>16</sup>. Schoofs *et al.*,<sup>20</sup> efetuaram um estudo, com 27 mulheres e 10 homens, nos quais foram determinados os níveis de sAA antes e depois destes realizarem um exame na faculdade, tendo concluído que o exame induziu aumentos significativos na atividade da sAA mas os aumentos não mostraram diferenças estatisticamente significativas entre homens e mulheres. Contudo, deve salientar-se que o número de participantes foi muito baixo<sup>16</sup>.

### *Influência da idade*

Em relação ao impacto da idade na atividade da sAA, os estudos que relacionem estas duas variáveis são escassos, e os resultados discrepantes <sup>7</sup>. Nos recém-nascidos a atividade da sAA é praticamente indetetável, aumentando continuamente até atingir os níveis de adulto nos três primeiros anos de vida <sup>16</sup>. A atividade da sAA não varia ao longo da vida adulta <sup>16</sup>. Contrariamente, os resultados obtidos por Nater *et al.*, <sup>19</sup> indicam que a trajetória diurna da sAA foi levemente influenciada pela idade, mostrando que a atividade da sAA diminui com o aumento da idade. Estes dados aparentemente contraditórios podem ser devidos às diferentes metodologias adotadas nos diferentes estudos, pois em alguns a atividade da sAA apenas foi medida num único momento e nos estudos que avaliam os perfis diurnos completos da sAA, as faixas etárias são muito limitadas para se tirar conclusões <sup>16</sup>.

### *Influência dos hábitos tabágicos*

Como a nicotina ativa o SNS, pode-se esperar que os hábitos tabágicos levem a um aumento da atividade da sAA <sup>16</sup>. Zappacosta *et al.*, <sup>21</sup> realizou um estudo, utilizando 20 voluntários, fumadores esporádicos, de ambos os sexos e os resultados obtidos mostraram que a atividade da sAA diminuiu cerca de 44%.

Num outro estudo elaborado por Goi *et al.*, <sup>22</sup> com o objetivo de explorar se o hábito de fumar afeta a reatividade da peroxidase oral no stresse mental, tendo sido também avaliada a atividade da sAA nessas condições. As respostas aos diferentes testes foram comparadas entre fumadores e não fumadores, e os resultados daí obtidos mostram que apesar da atividade da sAA não ter aumentado em ambos os grupos, os níveis basais da sAA foram inferiores nos fumadores em comparação com os não fumadores.

Estes resultados, não expectáveis podem ser explicados pelo fato do fumo do tabaco ter efeitos nocivos, tanto nos tecidos orais com também nas proteínas salivares, onde está incluída a sAA, levando a uma incapacidade funcional <sup>16</sup>.

### *Influência do Exercício Físico*

A atividade física é um outro forte ativador do SNS <sup>10</sup> e em relação a esta variável foram realizados alguns estudos que investigaram os efeitos do exercício físico nos níveis de sAA. E em todos eles os resultados revelam que a sAA aumenta consideravelmente durante o exercício físico intenso <sup>16</sup>. Em outras pesquisas foi também comparado a influência da

intensidade do treino na atividade da sAA, os quais revelaram um efeito dose-resposta, com maiores aumentos da sAA após uma prática de exercício intenso quando comparados com uma prática de exercício leve <sup>16</sup>. No entanto, praticamente não existe documentado se os níveis da sAA estão associados à performance dos indivíduos <sup>16</sup>. Portanto é assim possível concluir que o exercício físico é uma das variáveis que influênciam a atividade da sAA e que esta deve ser tomada em atenção e controlada.

## **4 SALIVA: AMOSTRA BIOLÓGICA CONFIÁVEL**

### **4.1 Fisiologia da Secreção Salivar e sua Composição**

A saliva é um biofluido, formado a partir de secreção glandular e que realiza várias funções importantes e essenciais para a manutenção da homeostase e proteção da saúde oral pela sua capacidade de lubrificação, atividade antimicrobiana e antiviral, efeito tampão e digestão dos alimentos <sup>23</sup>.

Trata-se de um fluido complexo, contendo na sua constituição componentes derivados da superfície das mucosas orais, dentes, fendas gengivais, microrganismos que colonizam a boca e outras substâncias exógenas fornecendo assim uma importante visão da relação do hospedeiro com o seu ambiente envolvente. Por esse motivo é de extrema importância entender todo o mecanismo da sua secreção para que seja possível compreender como as alterações na sua composição podem estar associadas a uma dada patologia ou à sua fisiologia <sup>24</sup>.

A saliva resulta da mistura dos fluidos produzidos pelas glândulas salivares exócrinas e compostas por diferentes tipos de células: células acinares (células excretoras) que podem ser serosas ou mucosas, células do sistema de ductos e células mioepiteliais; e ainda pelo fluido crevicular gengival o qual apresenta na sua constituição bactérias, células epiteliais, leucócitos e detritos alimentares <sup>25</sup>.

As glândulas salivares, localizadas em ambos os lados da face, são divididas em glândulas *major* e *minor*. Dentro das glândulas *major* incluem-se, as glândulas parótidas, submandibulares e sublinguais <sup>10</sup>.

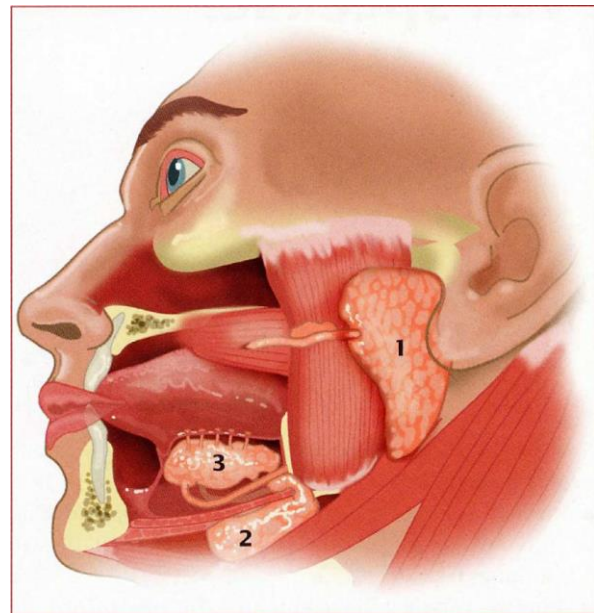
As glândulas parótidas são de maiores dimensões, estão localizadas junto aos primeiros molares superiores e são constituídas por células acinares serosas que produzem pouca mucina (principal constituinte do muco)<sup>26</sup> tendo elevada concentração de sAA <sup>27</sup>.

As glândulas submandibulares são glândulas mistas que compreendem na sua constituição tanto células acinares mucosas como serosas secretando assim uma saliva mais viscosa quando comparada com a parótida <sup>27</sup>. As glândulas sublinguais são as menores das glândulas *major* e são formadas maioritariamente por células acinares mucosas, produzindo assim uma saliva viscosa tal como as submandibulares, no entanto a sua contribuição para o volume total da saliva é pequena <sup>27</sup>. Relativamente às glândulas *minor*, são compostas em grande parte por células acinares mucosas<sup>24</sup>, encontram-se distribuídas por toda a cavidade oral, nos lábios, palato e língua e apesar da sua contribuição relativamente baixa para o volume total de saliva, estas glândulas secretam uma grande fração de proteínas salivares com grande importância para a lubrificação dos tecidos orais <sup>27,28</sup>.

As células encontradas nos ductos salivares são classificadas como intercaladas, estriadas e excretoras. O sistema de ductos das glândulas parótidas e submandibulares são bem desenvolvidos e ramificados enquanto nas glândulas sublinguais e nas várias glândulas *minor*, os ductos intercalados e estriados estão escassamente distribuídos ou mesmo ausentes <sup>27</sup>.

Em torno das terminações secretoras e dos ductos intercalares encontram-se as células mioepiteliais contráteis que auxiliam na promoção do fluxo da saliva pelos ductos por meio de constrição ativada por um estímulo <sup>24,27</sup>.

Como os ácinos se encontram circundados por redes de capilares a composição da saliva é muito semelhante ao plasma permitindo a passagem de substâncias da circulação sanguínea



**Figura 2:** Disposição anatômica das três glândulas *major*. (1) Glândula Parótida; (2) Glândula Submandibular; (3) Glândula Sublingual. Figura retirada da ref<sup>a</sup> 28.

para as glândulas salivares num processo de depuração<sup>29</sup>. Esse transporte é feito por difusão passiva, ultrafiltração, transporte ativo e transudação de compostos plasmáticos. Por difusão passiva atravessam as membranas celulares moléculas lipofílicas como hormonas esteroides. A ultrafiltração ocorre através de junções comunicantes (*gap junction*) entre as células acinares e conduz ao transporte de moléculas polares de baixo peso molecular. O mecanismo de transporte ativo aplica-se a muitos iões (e.g. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e a alguns peptídeos como a insulina. Do fluido crevicular pode ocorrer a deslocação de compostos plasmáticos por um mecanismo de transudação<sup>29,26</sup>.

De uma forma geral pode entender-se que a formação da saliva ocorre segundo um modelo de dois passos, sendo o primeiro a produção de saliva primária pelas células acinares, a qual é isotónica, com concentrações em Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> semelhantes às do plasma. O segundo passo é a modificação da saliva primária que ocorre ao nível dos ductos, à medida que esta passa através dos ductos vai sofrendo alterações em grande parte devido à reabsorção seletiva de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (sem água) com paralela excreção de K<sup>+</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> por transporte ativo através de canais iónicos, e por as células do sistema de ductos apresentarem relativa impermeabilidade à água, a saliva então resultante é hipotónica em comparação ao plasma. Ao longo de todo este processo ocorre também a secreção local de certos componentes orgânicos sendo posteriormente excretados para a saliva, essa secreção ocorre ao nível das células acinares mas também pode ocorrer ao longo do sistema de ductos<sup>26,27</sup>.

Ao longo do dia dá-se uma contínua secreção de saliva, um adulto saudável normalmente produz um volume de saliva entre os 500-1500 ml por dia a uma taxa de 0.5 ml/min<sup>30</sup>.

No entanto a velocidade a que se dá essa secreção (taxa de fluxo salivar) varia de individuo para individuo, e a composição da saliva está intimamente dependente da existência de estímulos exógenos (mastigar alimentos, cheiros)<sup>24</sup> como também das condições fisiologias e patológicas do individuo<sup>30</sup>.

A contribuição das diferentes glândulas para o volume salivar varia, em função de serem estimuladas ou não<sup>26</sup>. A maior contribuição para a produção de saliva parte das glândulas major e dentro destas as que concedem um maior aporte são as submandibulares, em seguida a parótida e por fim a sublingual, os remanescentes derivam das numerosas glândulas *minor*<sup>29</sup>.

**Tabela 1.** Contribuição das diferentes glândulas salivares para o volume total da saliva, com base na Ref<sup>a</sup> 31.

	Glândula Parótida	Glândula Submandibular	Glândula sublingual	Glândulas minor
<b>Não estimulada %</b>	20	65	5	10
<b>Estimulada %</b>	> 50	35	7	8

Como já referido anteriormente a saliva é formada a partir do plasma e como tal o componente mais abundante na sua constituição é a água, representando um total de 99%. Da sua constituição ainda fazem parte componentes orgânicos proteicos e não proteicos e eletrólitos com concentrações que variam de individuo para individuo e também ao longo do dia <sup>25</sup>.

A concentração de eletrólitos na saliva está também dependente da forma de como esta é obtida, existindo uma diferença significativa se esta foi recolhida de forma estimulada ou não.

Segundo Chiappin *et al.*<sup>30</sup> a composição da saliva em comparação ao plasma será é mostrada na tabela 2.

**Tabela2.** Comparação de eletrólitos entre saliva estimulada e não estimulada e o plasma.

Compostos inorgânicos (mmol/l)	Saliva total não estimulada	Saliva total estimulada	Plasma
<b>Na<sup>+</sup></b>	5	20-80	145
<b>K<sup>+</sup></b>	22	20	4
<b>Cl<sup>-</sup></b>	15	30-100	120
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	1-4	1-4	2.2
<b>HCO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	5	15-80	25
<b>Mg<sup>2+</sup></b>	0.2	0.2	1.2
<b>NH<sub>3</sub></b>	6	3	0.05

Pela observação da tabela 2 pode concluir-se que as concentrações dos diferentes eletrólitos são bastantes diferentes quando comparamos uma saliva estimulada com uma saliva não estimulada.

Dos componentes orgânicos, o ácido úrico é o mais importante mas também é possível detetar bilirrubina, creatinina e ainda lípidos como colesterol e ácidos gordos. Através de vários métodos de pesquisa foi possível identificar mais de 300 tipos de proteínas na composição da saliva. De origem glandular encontramos proteínas como a sAA, histatinas, cistinas, lactoferrinas, lisozimas e mucinas, dentro das derivadas do plasma encontramos albumina e imunoglobulina A <sup>30</sup>.

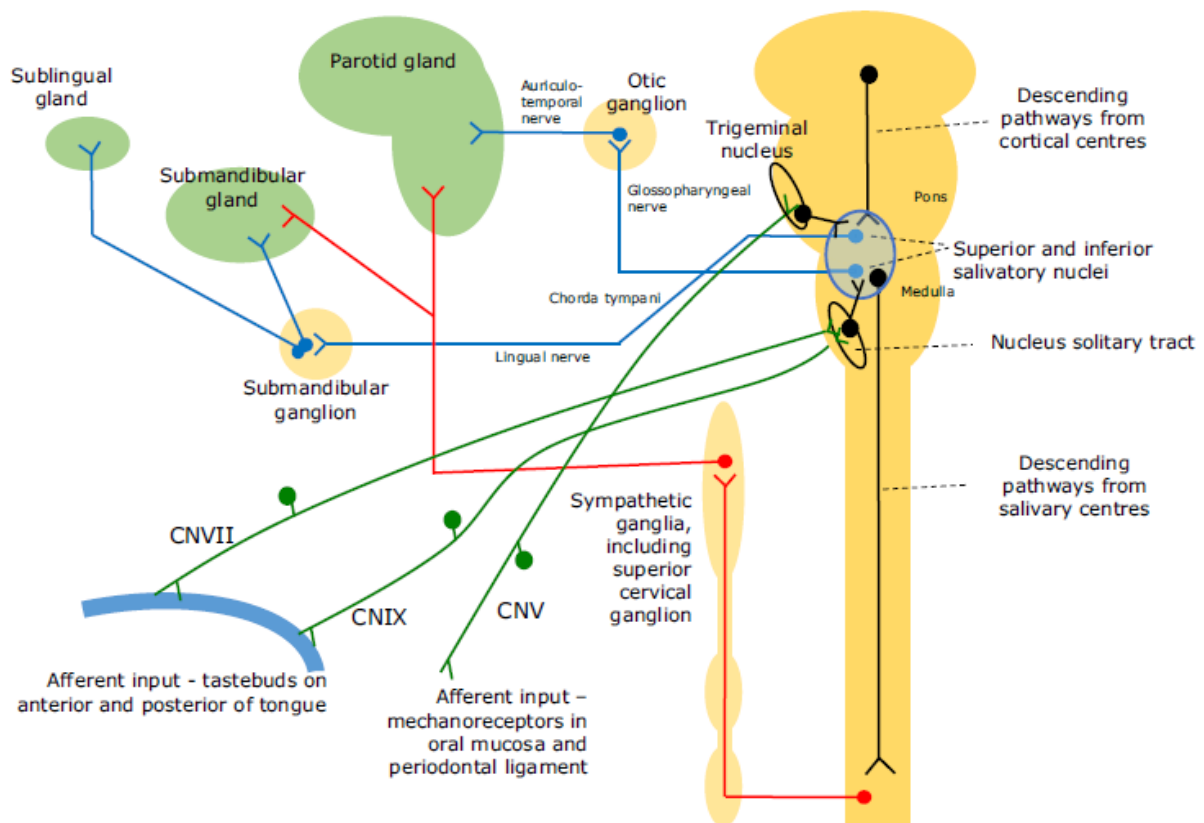
Como já referido a sAA é a proteína mais abundante na saliva e é maioritariamente produzida pela glândula parótida. Enquanto as mucinas são secretadas pelas glândulas submandibular, sublingual e pelas glândulas *minor*, e a imunoglobulina A é comum às diferentes glândulas <sup>30</sup>.

#### **4.2 Regulação Neuronal**

A secreção salivar está exclusivamente sob ação do Sistema Nervoso Autónomo (ANS), as glândulas salivares estão densamente inervadas por nervos simpáticos e parassimpáticos <sup>24,25</sup>. As células acinares serosas das glândulas estão sob controlo do simpático enquanto as células acinares mucosas e células do sistema de ductos estão sob o controlo de ambos, portanto os estímulos colinérgicos e  $\alpha$ - $\beta$  adrenérgicos podem modificar as concentrações de proteínas e eletrólitos bem como a viscosidade da saliva secretada <sup>30,10</sup>.

O controlo da secreção salivar parte do centro salivar que se encontra no bulbo cerebral sendo constituídos por dois núcleos (inferior e superior). Existem três tipos de estímulos que afetam a produção de saliva, o mecânico (ato de mascar), o gustativo (alimentos ácidos estimulam mais a produção de saliva) e olfativo <sup>32</sup>.

A secreção salivar começa através de estímulos que são detetados por quimiorreceptores das papilas gustativas que se encontram predominantemente no epitélio da língua (estímulos gustativos) e por mecanorreceptores (estímulos mecânicos) na mucosa oral, gerando sinais aferentes transmitidos pelos nervos facial, glossofaríngeo e trigémeo para os núcleos salivares <sup>27, 24</sup>.



**Figura 3:** Mecanismo da secreção salivar. Verde: Nervos sensoriais aferentes; Azul: Nervos parassimpáticos eferentes; Vermelho: Nervos simpáticos eferentes; Preto: Nervos do SNC; CN IX: Nervo glossofaríngeo; CN V: Nervo trigêmeo; CN VII: Nervo facial, figura retirada da ref<sup>24</sup>.

### Sistema Nervoso Parassimpático (PNS)

Este sistema tem por base o centro salivar, nos núcleos inferior e superior, que possuem ligação com os neurónios motores dos nervos glossofaríngeo e facial. Os sinais gerados nas fibras dos nervos facial e glossofaríngeo são retransmitidos para o núcleo do trato solitário no bulbo cerebral e daqui retransmitidos para os núcleos inferior e superior <sup>24</sup>.

As fibras motoras do glossofaríngeo saem do núcleo salivar inferior, têm ramificações sinápticas no gânglio ótico e inervam as glândulas parótidas <sup>10</sup>. Por sua vez os estímulos eferentes parassimpáticos, que chegam às glândulas submandibular e sublingual provém do nervo facial, via gânglio submandibular<sup>10</sup>. Aqui os neurónios pós-ganglionares parassimpáticos libertam a acetilcolina que interagem com os recetores muscarínicos nas células acinares e células do sistema de ductos e a ação fisiologia que resulta é o aumento da taxa de secreção salivar <sup>27</sup>.



A inervação das glândulas submandibular e parótida tem origem a partir dos segmentos torácicos T1 a T3, com os nervos pré-ganglionares a estabelecer conexões no gânglio cervical superior <sup>24</sup>. Os neurónios simpáticos pós-ganglionares libertam noradrenalina que interage com recetores  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos nas células acinares e células do sistema de dutos. A ativação dos recetores  $\alpha$  leva a um aumento intracelular de cálcio, a ativação dos recetores  $\beta$  provoca um aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que ativa a proteína cinase A, levando à exocitose dos grânulos armazenados contendo proteínas e à sua libertação na saliva <sup>10</sup>. A estimulação simpática leva a uma menor taxa de fluxo salivar no entanto a saliva torna-se mais rica em proteínas <sup>27</sup>.

### **4.3 Utilidade no Diagnóstico Clínico**

O diagnóstico das doenças humanas e sua monitorização é uma realidade que invoca crescente preocupação no sentido do desenvolvimento de novos métodos de diagnósticos complementares mais sensíveis e que permitam uma deteção mais precoce <sup>33</sup>.

Nas últimas décadas o interesse no desenvolvimento de testes de diagnósticos rápidos e menos invasivos tem crescido exponencialmente <sup>26</sup>, o que fundamenta a extensa investigação da saliva como um fluido biológico e matriz bioanalítica para o diagnóstico clínico precoce, prognóstico e monitorização da terapêutica <sup>33</sup>.

A saliva é um fluido que apresenta uma multiplicidade de constituintes, encontrando-se muitos deles alterados por diversas condições fisiopatológicas<sup>23</sup>. Os avanços da ómica da saliva como genómica, transcriptómica, metabolómica, proteómica juntamente com o desenvolvimento do suporte informático e ferramentas estatísticas<sup>23</sup> permitiu a descoberta de biomarcadores salivares com utilidade em diferentes áreas como endocrinologia, medicina desportiva, forense e imunológica <sup>33,29</sup>.

As vantagens da saliva como uma ferramenta clínica sobre o soro, tecidos e outros fluidos biológicos (sangue e urina) derivam do facto de esta oferecer um meio de colheita de amostra não invasivo o que permite uma boa cooperação por parte dos doentes, de recolha e armazenamento relativamente simples não sendo necessário pessoal especializado repercutindo uma boa relação benefício-custo, e no facto da sua colheita ser segura quando comparada com o sangue <sup>30, 26, 33</sup>.

No entanto algumas barreiras têm que se ultrapassar para tornar esta matriz de uso habitual no diagnóstico clínico. As concentrações plasmáticas dos parâmetros bioquímicos têm intervalos de referência bem estabelecidos, o mesmo não acontece para os parâmetros salivares, os quais apresentam uma grande variação<sup>30</sup>, e intervalos de referência amplos, o que pode dificultar uma interpretação clínica dos resultados<sup>23</sup>. Como se pode verificar na tabela 3.

As variações fisiológicas que a saliva apresenta podem levar a uma difícil padronização das análises salivares, favorecendo o recurso aos fluidos biológicos com estabilidade comprovada<sup>23</sup>, mas esta contrariedade pode ser vista como um desafio ao desenvolvimento de tecnologias analíticas no sentido de estabelecer intervalos de referência dos parâmetros salivares, pois visto que muitos dos constituintes da saliva derivam do plasma e vários parâmetros bioquímicos e imunológicos (imunoglobulinas) podem ser medidos tanto no sangue como na saliva, tornam a saliva uma potencial matriz em alternativa ao plasma<sup>30</sup>.

**Tabela 3:** Intervalos de referência para hormonas e parâmetros bioquímicos encontrados na saliva e no plasma.

Analyte	Saliva collection method	Saliva	Plasma
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	Unstimulated Plastic	3.0-29.0 <sup>1</sup>	136.0-145.0 <sup>1</sup>
K <sup>+</sup> (mmol/L)	Unstimulated Plastic	6.4-36.6 <sup>1</sup>	3.5-4.5 <sup>1</sup>
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	Unstimulated Plastic	0.88-2.5 <sup>1</sup>	1.15-1.33 <sup>1</sup>
Cl <sup>-</sup> (mmol/L)	Unstimulated Plastic	0-27 <sup>1</sup>	98-107 <sup>1</sup>
UA (mmol/L)	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	0.07-0.32 <sup>1</sup>	0.24-0.49
Urea (mmol/L)	Unstimulated Polypropylene	1.66-7.5 <sup>1</sup>	2.16-8.2 <sup>1</sup>
	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	0.17-1.50 <sup>1</sup>	60-80 <sup>1</sup>
Protein (g/L)	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	0.18-5.30 <sup>1</sup>	
	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	42-407 <sup>1</sup>	489-776 <sup>1</sup>
TAS (µmol/L)	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	5.0-155.4 <sup>1</sup>	not reported
SAA	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	24.0-368.0 <sup>1</sup>	not reported
	Stimulated Liquid (SCS <sup>®</sup> )	113-609 <sup>1</sup>	180-360 <sup>1</sup>
LD (U/L)	Unstimulated Plastic	10.9-40.3 <sup>1</sup>	17-44 <sup>1</sup>
	Unstimulated Polystyrene	3.57-35.1 <sup>1</sup>	
Cortisol (nmol/L)	Stimulated Cotton (Salivette <sup>®</sup> )	1.14-10.3 <sup>1</sup>	
	Stimulated Cotton (Salivette <sup>®</sup> )	<3.0	
	Stimulated Cotton (Salivette <sup>®</sup> )	1.5±0.3 <sup>2</sup>	0.6-39.4 <sup>1</sup>
DHEA (nmol/L)	Stimulated Cotton (Salivette <sup>®</sup> )	18.71±5.01 <sup>2</sup>	52.0-280.0 <sup>1</sup>
Free testosterone (pg/mL)	Unstimulated Plastic		

Apesar deste obstáculo existem bem documentados biomarcadores específicos de um número de patologias<sup>23</sup>, como se mostra na tabela 4.

**Tabela 4:** Biomarcadores salivares específicos para diversas patologias.

Condition	Specific salivary markers
Malignancies	SA↑, Long non-coding RNA↑, p53 antibodies*, CA15-3↑, Cellular erythroblastosis oncogene B-2↑, Cancer antigen 125↑, Fibroblast growth factor 2↑, Fibroblast growth factor receptor 1↑, Prostate specific antigen↑, Cortisol↑, LD↑, Nitrate↑, Adenosine deaminase↑, Alpha-defensins↑, Beta-defensins↑, Endothelins↑, Statherins↓, Interleukin-8↑, Thioredoxin↑
DM	Glucose↑
Renal condition	Cortisol↑, Nitrite*, UA*, Alpha-amylase*, Lactoferrin*, Creatinine↑
Sjogren's Syndrome	Lactoferrin↑, Beta-2-microglobulin↑, Lysozyme C↑, Cystatin C↑, Amylase↓, Carbonic anhydrase↓
Multiple sclerosis	IgA↓
Sarcoidosis	Alpha-amylase↓, Kallikrein↓
Bone turnover markers	Deoxypyridinium↑, Osteocalcin↑, Hepatocyte growth factor↑, Interleukin-1-beta↑, Alkaline phosphatase↑
Cardiovascular diseases	C-reactive protein↑, Myoglobin↑, Creatinine kinase myocardial band↑, Cardiac troponins↑, Myeloperoxidase↑, Tumor necrosis factor α↑, Matrix metalloproteinase-9↑, Intercellular adhesion molecule-1↑, Soluble CD40 ligand↑, Lysozyme↑
Dental caries and periodontal diseases	Aspartate aminotransferase↑, Alkaline phosphatase↑, UA↓, Albumin↓, Polymeric immunoglobulin receptor↓, Actin-related protein 3↓, Carbonic anhydrase VI↓, Interleukin 1 Receptor antagonist↓, Platin-2↑, Leukocyte elastase inhibitor↑, Immunoglobulin J↑, Immunoglobulin↑, Cystatin S↑, Amylase*, Calprotectin*, Histatins*, Lysozyme↑, Lactoferrin↑, Defensins*, Peroxidases*, PRPs*, MUC*, Prostaglandin E(2)*, Albumin↑, LD↑
Diseases of the adrenal cortex	Cortisol↑
Psychological conditions	SAA↑, Cortisol*, Substance P*, Lysozyme↑, Secretory IgA↓, Testosterone↑
Occupational and environmental medicine	Cortisol↑, IgA↓, Lysozyme↓, Chromogranin↑, SAA↑, Lead↑, Cadmium↑
Infections (bacterial, fungal, viral)	Measles virus-specific IgM↑, HIV—HIV-1*, HIV-2—antibodies*, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ↑, MUC 5B↑, MUC 7↑, Candidiasis immunoglobulins*, Hsp 70*, Calprotectin*, Histatins*, MUC*, Basic PRPs*, Peroxidases*, IgM↑, IgG (dengue) ↑
Cystic fibrosis	Cathepsin-D↑, LD↑
Ectodermal dysplasia	Inorganic constituents↑, Total protein↑
Obesity	CRP↑, Leptin↑, Insulin↑, Adiponectin↓
Metabolic Syndrome	UA↑

As análises salivares têm sido usadas principalmente no diagnóstico de doenças sistêmicas que envolvem as glândulas salivares e a cavidade oral <sup>30</sup>, no entanto, atualmente, na área da endocrinologia, utiliza-se a saliva para a dosagem de hormonas esteroides, como cortisol, cortisona e testosterona, pelo caráter não invasivo da amostragem, pois a colheita de saliva não possui o principal problema da colheita de sangue por punção venosa a qual pode resultar um aumento das hormonas de stresse levando assim a falsos resultados <sup>29</sup>. Além disso as hormonas esteroides no plasma estão predominantemente ligados à albumina, facto que as torna incapazes do passar do sangue, através das membranas plasmáticas, para a saliva <sup>30</sup>. Com os recetores dos esteroides localizados no citosol ou dentro do núcleo, apenas a fração livre pode realizar a sua atividade fisiológica <sup>29</sup>, como a mesma fração livre passa do plasma para a saliva por difusão passiva já descrita, pensa-se que os esteroides salivares refletem as concentrações dos esteroides não ligados fisiologicamente ativos no plasma <sup>30</sup>.

Pela vantagem exposta acima da amostragem da saliva não induzir stresse nem ansiedade, esta matriz também tem sido extensivamente usada na pesquisa comportamental, recorrendo à sAA como um biomarcador do stresse agudo <sup>33</sup>.

## 5 BIOSSENSOR PARA A DETEÇÃO DA ALFA-AMÍLASE SALIVAR

Geralmente, as amostras de saliva recolhidas dos indivíduos são processadas em laboratórios centralizados, o que resulta num longo ciclo, desde a recolha, posterior medição e por fim os resultados, podendo durante estas etapas ocorrer erros no processo analítico <sup>34</sup>.

Os biossensores acoplados a dispositivos de medição portáteis são específicos e de utilização simples na determinação de vários metabolitos, contornando assim as limitações acima mencionadas. Uma outra vantagem na utilização advém da amostra ser processada imediatamente após a colheita, não requerer processamento prévio, o tempo de resposta é dado em poucos minutos e a possibilidade de ser usado em qualquer lugar <sup>35</sup>.



**Figura 4:** Biossensor para a deteção da sAA e tira de teste. Retirada da ref<sup>a</sup> <sup>34</sup>.

## 5.1 Dispositivo de Medição: O Seu Desenvolvimento

Yamaguchi *et al.*<sup>36</sup> desenvolveu um novo biossensor para, através da medição atividade da sAA, ilustrar a sua viabilidade para a monitorização in vivo de estímulos simpáticos.

O biossensor para a medição da sAA baseia-se num sistema de medição colorimétrico em que a refletância do produto da reação química é medida fotometricamente a 430 nm, permitindo assim determinar a concentração da sAA<sup>34</sup>. O dispositivo de medição é constituído pelo sistema de leitura e pela tira de teste descartável<sup>36</sup>.

A tira de teste integra um material absorvente para a colheita de saliva, na sua extremidade um papel reagente contendo 2-cloro-4-nitrofenil-4-O-β-D-galactopiranosilmaltoside (Gal-G2-CNP), um substrato para a sAA.

### 5.1.1 Temperatura e pH

No sentido de tornar as variações individuais da sAA negligenciáveis foram propostas por Yamaguchi *et al.*<sup>36</sup> equações de normalização, determinadas experimentalmente, para o ajuste do pH e temperatura, sendo que cada valor teórico determinado foi introduzido posteriormente na memória do dispositivo de medição.

A unidade de medida da atividade da sAA (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa o equivalente de 1 μmol de substrato por minuto a 37°C (U/min)<sup>16</sup>, assim o valor da atividade da sAA obtida à temperatura de 37°C será tido como o valor de referência (100%)<sup>36</sup>, além desse aspeto tem sido relatado que o pH da saliva varia, entre pH 6.0-7.5<sup>36</sup>.

No estudo referido foi determinada a atividade da sAA, a 37°C, e o seu pH ótimo, em três indivíduos saudáveis utilizando o biossensor.

Relativamente à temperatura, as atividades encontradas foram de 33.2, 71.4 e 99.3 kU/l (37°C) em seguida a atividade da sAA foi medida à temperatura de 10, 20 e 30°C utilizando um espectrofotómetro<sup>36</sup>. Foi observado que a atividade da sAA diminui proporcionalmente com a temperatura<sup>36</sup>, daqui foi possível determinar uma equação (Eq.1) ajustada à temperatura para normalizar a atividade da sAA (AMY) em relação às condições padrão.

$$\% \text{AMY} = 0.078 T^2 + 0.59T + 12.1 (\%) \quad \text{Eq. 1}$$

Para que os resultados medidos não fossem afetados pela temperatura ambiente, um sensor térmico foi construído no monitor, bem como a equação de ajuste de temperatura foi

introduzida na memória do monitor. Assim este monitor pode medir a temperatura ambiente ao mesmo tempo que analisa a atividade da sAA e automaticamente ajusta os valores medidos à temperatura de 37°C <sup>36</sup>.

Relativamente ao pH, das amostras recolhidas, este foi ajustado para os valores de 4.4, 5.5, 6.1, 6.5, 7.0, 8.1 e 9.1 com uma solução de 0.1 NaOH e NH<sub>4</sub>Cl diluído em 1% de albumina sérica bovina (BSA). Seguidamente, foram determinadas a atividade da sAA nas diferentes amostras com pH ajustado, como resultado, foi possível verificar que a atividade da sAA atingiu um máximo ao pH de 6.5, diminuindo quando o pH muda para zona ácida ou básica <sup>36</sup>. Daqui foi possível obter equação ajustada (Eq.2) ao pH para normalizar a atividade da sAA. Ao inserir esta equação ajustada na memória do dispositivo de medição, a atividade da sAA medida é automaticamente ajustada ao pH 6,5 <sup>36</sup>.

$$\% \text{AMY} = -7.5\text{pH}^2 + 99.9\text{pH} - 234.3 (\%) \quad \text{Eq. 2}$$

### 5.1.2 Exatidão e Precisão

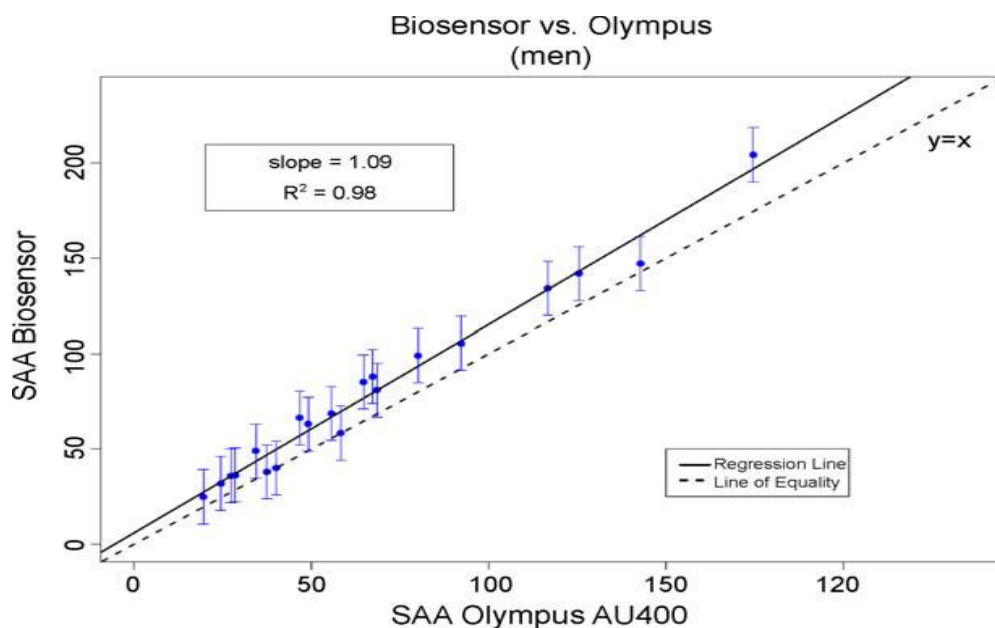
#### Exatidão

Num estudo desenvolvido por Shetty *et al.*<sup>34</sup>, foram avaliadas as características de desempenho analítico do biossensor para a determinação da atividade da sAA, utilizando amostras de saliva de vinte indivíduos saudáveis, em que foram avaliados os níveis da sAA com cinco biossensores e comparando as leituras com o método de referência que tem por base um analisador de química clínica (Olympus AU 400).

Neste estudo foi estabelecido também o intervalo linear do biossensor a partir de ensaios repetidos das mesmas amostras de saliva, e por regressão linear, verificou-se que os valores lidos pelo biossensor tinham uma boa correlação com os valores medidos pelo analisador Olympus AU 400 (“valores verdadeiros ou de referência”) ao longo de um intervalo de linearidade que se estendia de 10 a 230 U/ml, havendo um desvio de linearidade acima dos 250 U/ml <sup>34</sup>.

Dentro do intervalo de linearidade do biossensor (10-230 U/ml), verificou-se a concordância entre as leituras obtidas nos 5 biossensores e o analisador Olympus AU 400 <sup>34</sup>.

As médias dos valores obtidos com os biossensores mostraram uma excelente correlação ( $R^2=0.98$ ) e declive da reta de 1.09 com os valores obtidos com o analisador Olympus AU 400<sup>34</sup>, como é possível verificar na figura 5.



**Figura 5:** Correlação entre os biossensores da sAA e o analisador Olympus para amostras de saliva de 20 indivíduos.

### Precisão

A precisão do biossensor foi estabelecida por medições de amostras de saliva recolhidas com o mesmo dispositivo. O desvio padrão relativo obtido para as 9 amostras, em cada concentração dentro da gama dinâmica, foi em média, de 8.1% (variações de 4.9 a 13.3%), e os valores de todas as 6 medições replicadas, em ambos os dias, foi em média de 8.4% (variações de 5.5 a 11.4%). Estes resultados indicam uma precisão adequada do biossensor (desvio padrão médio inferior a 9%) aceitável para uso médico<sup>34</sup>. Em contraste, o desvio padrão relativo do analisador Olympus AU 400 foi em média de 1.1% (variação de 0 a 1.9%). Os desvios padrão relativos obtidos a partir das medições repetidas com os 5 biossensores apresentaram uma média de 13.8% (variações de 5.3 a 21.0%), sugerindo diferenças entre os biossensores<sup>34</sup>. Para contornar essas diferenças, estratégias podem ser adotadas para refinar a precisão das medições, como o uso de tiras de calibração padronizadas com refletância variadas<sup>34</sup>.

## 6 Colheita da Saliva

A forma com é feita a colheita da saliva é de extrema importância, porque influencia significativamente os resultados. Vários métodos de colheita de saliva têm sido descritos nos últimos anos, e utilizados diversos dispositivos para a realização desta tarefa <sup>29</sup>.

Um outro aspeto a ter em atenção prende-se com o local onde a amostra de saliva é colhida, ou seja, se a amostra é proveniente de toda a cavidade oral (“saliva inteira”) ou se é proveniente de glândulas salivares específicas <sup>16</sup>. Este aspeto foi investigado por Peng *et al.* <sup>8</sup> no qual foi estudada a utilidade de um biossensor para a deteção da sAA, como biomarcador do stresse, por médicos militares submetendo-os a situações simuladas de resgate em combate, em que foram utilizados dois métodos de amostragem: diretamente a partir da saliva com uma tira de teste colocada sob a língua, e colheita de um volume fixo de saliva através de uma pipeta com posterior colocação na tira de teste, seguido da análise da amostra pelo biossensor. Os resultados obtidos dos diferentes métodos de colheita foram comparados aos obtidos pelo método de ensaio enzimático <sup>8</sup>, o qual é o considerado o método padrão para a análise da sAA <sup>16</sup>. Os dados daí obtidos revelaram que o método da colheita sob a língua não detetou qualquer aumento significativo na atividade da sAA, em contraste com os aumentos significativos detetados quando era utilizado o método de pipetagem e o método padrão <sup>8</sup>.

A ausência de correlação entre os dois métodos pode, em parte ser explicada, pela diferença no local de amostragem da saliva, o que vai ao encontro ao já exposto, as diferentes glândulas salivares são responsáveis por sintetizar diferentes proteínas, sendo que a sAA é maioritariamente produzida pela glândula parótida <sup>30</sup>, ao colocar a tira de teste sob a língua a saliva dali recolhida será proveniente da glândula sublingual, assim a sua concentração em sAA será inferior quando comparada aos dois outros métodos que recolheram a saliva total da cavidade oral <sup>8</sup>, a qual é uma combinação representativa da saliva produzida por todas as glândulas salivares <sup>16</sup>.

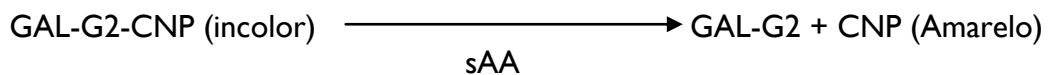


## 7 Medição da Atividade da Alfa-Amilase

### Salivar

A extremidade coletora da tira de teste é colocada diretamente na cavidade oral sob a língua, o coletor rapidamente (cerca 10 s) fica saturado com volumes de saliva de 25  $\mu\text{l}$  <sup>36,34</sup>. A tira é inserida no leitor e a alavanca **(a)** levantada para ativar o leitor e permitir a transferência da saliva para o papel reagente **(b)** <sup>36,34</sup>.

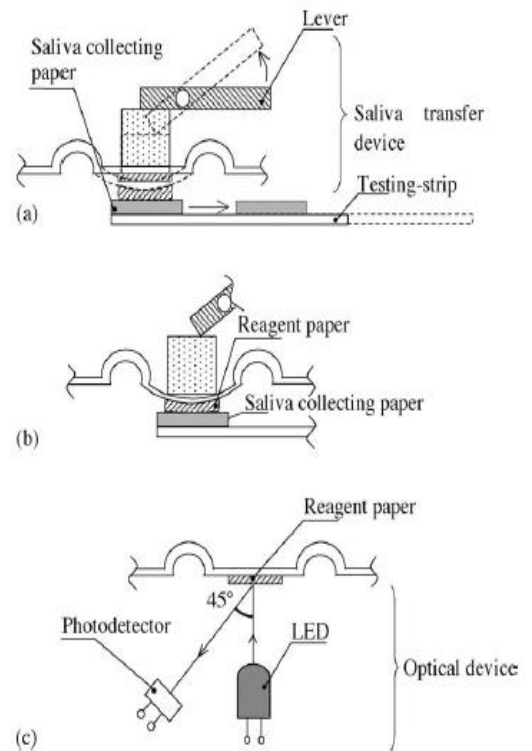
Após um intervalo de dez segundos, um sinal sonoro indica o término da transferência da saliva e a tira de teste é então retraída. A sAA presente na saliva começa a hidrolisar o substrato GAL-G2-CNP, o produto resultante CNP tem uma cor amarela, de acordo com a seguinte reação <sup>36,34</sup>:



A atividade enzimática é determinada pela medição de refletância do produto formado no papel reagente (esta determinação ocorre automaticamente pelo dispositivo ótico e tem a duração de aproximadamente trinta segundos **(c)** <sup>36</sup>. A intensidade da cor é proporcional à concentração da sAA. A unidade de microprocessamento do biossensor calcula o nível da sAA e exibe como uma leitura digital (0-999) juntamente com o registo da data e hora <sup>34</sup>. Para todo este processo, desde a colheita da saliva, transferência e medição, um minuto é o suficiente para a medição da atividade da sAA <sup>36</sup>.

## 8 Utilidade do Biossensor no Campo Militar

As missões para cenários de combate ou até mesmo os treinos militares envolvem um amplo espectro de agentes indutores de stresse, como incerteza, longas horas de trabalho, privação de sono, risco de morte ou doença <sup>37</sup>.



**Fig 7:** Mecanismo de transferência da saliva e medição da atividade da sAA (LED:díodo emissor de luz). Retirado da ref<sup>a</sup> <sup>36</sup>.

Embora o stresse daí resultante, nem sempre leve a consequências negativas, ele pode prejudicar o bem-estar e o desempenho operacional do soldado<sup>8</sup>, pois por mais bem treinado mentalmente e fisicamente que um soldado possa estar, os seres humanos permanecem vulneráveis ao stresse<sup>37</sup>. E como já referido a exposição a elevados níveis de stresse ou uma exposição crónica provocam efeitos deletérios para o organismo.

A possibilidade da monitorização dos níveis de stresse a que estão sujeitos os militares seria de grande utilidade no sentido de prevenir o desenvolvimento, a longo prazo, de um certo número de patologias.

Pela comprovada relação da resposta da sAA ao stresse, aliada à facilidade de obter amostras de saliva, a utilização deste biomarcador seria de grande utilidade, pois este pode ser avaliado de modo relativamente fácil e económico sem a necessidade de material técnico sofisticado<sup>16</sup>, características essas de extrema importância quando implicam uma avaliação no terreno.

O desenvolvimento de biossensores para a deteção da sAA, contribuem de forma excepcional para a implementação dessa realidade. Foi exposto anteriormente que as excelentes características de desempenho do biossensor retiram a análise da sAA do domínio laboratorial<sup>34</sup>. Além disso, características como a sua fácil utilização, durabilidade, mínima manutenção, aliada à possibilidade de produzir resultados rápidos e confiáveis com apenas a necessidade de volumes de amostra na ordem dos microlitros, em tempo real<sup>34</sup>, torna a sua possível utilização de extrema necessidade na monitorização dos níveis de stresse experimentados pelos militares aquando das diversas operações e treinos por eles realizados.

## 9 Conclusão

Um grande número de métodos têm sido utilizados para quantificar os níveis de stresse, tais como testes psicológicos, medição da frequência cardíaca, pressão arterial, e biomarcadores na saliva (cortisol) e no sangue (adrenalina e noradrenalina) <sup>38</sup>.

No entanto a colheita de sangue pode se tornar inviável, na quantificação dos níveis de stresse, pois o próprio método em si, pode provocar um aumento das hormonas de stresse levando a falsos resultados <sup>29</sup>, tornando assim a análise da saliva como uma alternativa útil, a sua amostragem mostra-se não invasiva sem provocar stresse nos indivíduos <sup>38</sup>.

Em contraste com a libertação do cortisol, a sAA mostra-se um biomarcador mais prático para a quantificação dos níveis de stresse pois a sua resposta é mais rápida e marcada <sup>38</sup>.

Ao longo deste trabalho foi possível, de facto, comprovar a utilidade da sAA como um biomarcador do stresse, pelas provas dadas da sua relação com os mecanismos fisiológicos desencadeados em resposta a estímulos que induzem stresse.

Como também foi possível demonstrar, que um biossensor para a deteção da sAA fornece uma tecnologia analítica automatizada com precisão, exatidão e confiabilidade de medição que se aproxima dos elaborados analisadores usados no âmbito laboratorial <sup>34</sup>.

No entanto ainda existe a necessidade de desenvolver mais estudos para comprovar em que dimensão as diferentes variáveis (idade, sexo, atividade física, hábitos tabágicos) influenciam a atividade e os níveis da sAA no sentido de desenvolver procedimentos e metodologias *standard* para permitir, num futuro próximo, o uso do biossensor para a deteção da sAA na rotina da prática clínica.

## 10 Bibliografia

1. MÓRA, J. A. D. Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos e Farmácia Central do Exército desde 1918. (2010) 1–73 doi:10.1017/CBO9781107415324.004
2. CMDLog.Laboratorio Militar de Produtos Quimicos e Farmacêuticos. Acedido em 08/05/2018. Disponível em: <https://www.exercito.pt/pt/quem-somos/organizacao/ceme/cmdlog/lmpqf>.
3. N.º2 do Art.1.º, Alínea 2 do Art.2.º,da Portaria 1034/2009 de 11 de Setembro. Acedido em 08/05/2018.Disponível em: [http://www2.adfa-portugal.com/adfapor/index.php?option=com\\_content&view=article&id=319:portaria-no-10342009-de-11-de-setembro&catid=76&Itemid=7](http://www2.adfa-portugal.com/adfapor/index.php?option=com_content&view=article&id=319:portaria-no-10342009-de-11-de-setembro&catid=76&Itemid=7).
4. Alínea a) do Art. 3.º.Lei nº8/2012 de 21 de Fevereiro. Acedido em 27/04/2018.Disponível em:<https://dre.pt/pesquisa/-/search/542996/details/normal?l=1>.
5. Art.º 197 da Lei do Orçamento de Estado de 2018. Acedido em:10/05/2018. Diponível em:[http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei\\_mostra\\_articulado.php?artigo\\_id=2825A0197&nid=2825&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&so\\_miolo=&nversao=#artigo](http://www.pgdlisboa.pt/leis/lei_mostra_articulado.php?artigo_id=2825A0197&nid=2825&tabela=leis&pagina=1&ficha=1&so_miolo=&nversao=#artigo).
6. KARA E. HANNIBAL, M. D. B. Chronic Stress, Cortisol Dysfunction, and Pain: A Psychoneuroendocrine Rationale for Stress Management in Pain Rehabilitation. **94**, (2014).
7. SHIMAZAKI, M. et al. Clinical Performance of a Salivary Amylase Activity Monitor During Hemodialysis Treatment. **3**, (2008) 429–434.
8. PENG, H. T. et al. Performance Evaluation of a Salivary Amylase Biosensor for Stress Assessment in Military Field Research. *J. Clin. Lab. Anal.* **30**, (2016) 223–230.
9. BAÑUELOS, M. S., MUSLEH, A. & OLSON, L. E. Measuring Salivary Alpha-Amylase in the Undergraduate Neuroscience Laboratory. *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* **16**, (2017) A23–A27.
10. NATER, U. M. & ROHLEDER, N. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: Current state of research. *Psychoneuroendocrinology* **34**, (2009) 486–496.

11. MUSZIL, D. et al. Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction *Rajita. Changes* **34**, (2009) 1443–1453.
12. KVETNANSKY, R., SABBAN, E. L. & PALKOVITS, M. Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches. *Physiol. Rev.* **89**, (2009) 535–606.
13. TAVARES, M. L. & LEITE-MOREIRA, J. M. S. A. F. Stress – Respostas fisiológicas e fisiopatológicas. (2000).
14. MCEWEN, B. S., GRAY, J. D. & NASCA, C. Redefining neuroendocrinology: Stress, sex and cognitive and emotional regulation. *J. Endocrinol.* **226**, (2015) T67–T83.
15. ARMARIO, A. et al. What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? *Cell. Mol. Neurobiol.* **32**, (2012) 749–758.
16. ROHLEDER, N. & NATER, U. M. Determinants of salivary  $\alpha$ -amylase in humans and methodological considerations. *Psychoneuroendocrinology* **34**, (2008) 469–485.
17. NATER, U. M. et al. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int. J. Psychophysiol.* **55**, (2005) 333–342.
18. VAN STEGEREN, A., ROHLEDER, N., EVERAERD, W. & WOLF, O. T. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: Effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology* **31**, (2006) 137–141.
19. NATER, U. M., ROHLEDER, N., SCHLOTZ, W., EHLERT, U. & KIRSCHBAUM, C. Determinants of the diurnal course of salivary alpha-amylase. *Psychoneuroendocrinology* **32**, (2007) 392–401.
20. SCHOOF, D., HARTMANN, R. & WOLF, O. T. Neuroendocrine stress responses to an oral academic examination: No strong influence of sex, repeated participation and personality traits. *Stress* **11**, (2008) 52–61.
21. ZAPPACOSTA, B. et al. Inhibition of salivary enzymes by cigarette smoke and the protective role of glutathione. *Hum. Exp. Toxicol.* **21**, (2002) 7–11.
22. GOI, N. et al. Comparison of peroxidase response to mental arithmetic stress in saliva of smokers and non-smokers. *J. Toxicol. Sci.* **32**, (2007) 121–127.
23. NUNES, L. A. S., MUSSAVIRA, S. & BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as

- a non-invasive diagnostic fluid: A systematic review. *Biochem. Medica* **25**, (2015) 177–192.
24. PROCTOR, G. B. The physiology of salivary secretion. *Periodontol. 2000* **70**, (2016) 11–25.
  25. CARPENTER, G. H. The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **4**, (2013) 267–276.
  26. MORSE, S., GROER, M., SHELTON, M. M., MAGUIRE, D. & ASHMEADE, T. A Systematic Review. *J. Perinat. Neonatal Nurs.* **29**, (2015) 315–344.
  27. FEJERSKOV, O. & KIDD, E. *Dental caries: the disease and its clinical management*. Vasa (2008).
  28. APS, J. K. M. & MARTENS, L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci. Int.* **150**, (2005) 119–131.
  29. GRÖSCHL, M. Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis* **9**, (2017) 655–668.
  30. CHIAPPIN, S., ANTONELLI, G., GATTI, R. & DE PALO, E. F. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin. Chim. Acta* **383**, (2007) 30–40.
  31. PROCTOR, G. B. & CARPENTER, G. H. Salivary secretion: Mechanism and neural regulation. *Saliva Secret. Funct.* **24**, (2014) 14–29.
  32. HUMPHREY, S. P. & WILLIAMSON, R. T. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* **85**, (2001) 162–169.
  33. MALATHI, N., MYTHILI, S. & VASANTHI, H. R. Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dent.* **2014**, (2014) 1–8.
  34. SHETTY, V., ZIGLER, C., ROBLES, T. F., ELASHOFF, D. & YAMAGUCHI, M. Developmental validation of a point-of-care, salivary  $\alpha$ -amylase biosensor. *Psychoneuroendocrinology* **36**, (2011) 193–199.
  35. PETROPOULOS, K., PIERMARINI, S., BERNARDINI, S., PALLESCHI, G. & MOSCONE, D. Development of a disposable biosensor for lactate monitoring in saliva. *Sensors Actuators, B Chem.* **237**, (2016) 8–15.

36. YAMAGUCHI, M. et al. Hand-held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment. *Biosens. Bioelectron.* **21**, (2006) 1007–1014.
37. STETZ, M. C. et al. Stress, mental health, and cognition: a brief review of relationships and countermeasure. *Aviat. Space. Environ. Med.* **78**, (2007) B252–B260.
38. KARIBE, H., AOYAGI, K., KODA, A. & KAWAKAMI, T. Characteristics of the salivary alpha-amylase level in resting sublingual saliva as an index of psychological stress. *Stress Heal.* **27**, (2011) 282–288.

## **Anexos Referentes à parte I:**

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária



## Anexos

### Anexo I: Pedido de Encomenda

#### L.M.P.Q.F. Suc.COIMBRA

De:

Direcção Técnica: Dr. Vítor M. F. Rodrigues

L.M.P.Q.F. Suc. Coimbra

3000-237 COIMBRA

Telef.: 239 701772

Fax : 239 780892

Nº. Contribuinte : 600019675

C.R.C.

Matrícula Nº. 36080

Capital Social

#### Pedido de Encomenda Nº:15607

Data: 19-06-2018

Exmo(s) Sr(s):

**COOPROFAR**

Z.I. PORTELINHA - RUA PEDRO J. FERREIRA, 200/210

GONDOMAR

GONDOMAR

4429-209 GONDOMAR

Fax.....: 223401055

Telefone: 223401010

Nº. Contribuinte 500 336 512

Código Int.	Nome Comercial	Quantidade	Bónus	Preço Custo	Total
9917401	ACARILBIAL 200ML	2		5,26 €	10,52 €
3314382	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO RATIOPHARM 500 MG 20 COMP.	1		1,99 €	1,99 €
8563361	ADALAT CR 30 28COMP	8		4,39 €	35,12 €
5580519	Amoxicilina + Ácido Clavulânico Actavis 875 Mg + 125 Mg 16	4		3,97 €	15,88 €
5069224	ATORVASTATINA OCRAM 20 MG 28 COMP. REVEST. POR PE	2		6,17 €	12,34 €
8683052	BEKUNIS CHA 0 80G(8683052)	1		4,71 €	4,71 €
3080983	BENESTAN OD CX 30 CM	2		7,92 €	15,84 €
8436006	BETADINE SOL.ESPUMA 125ML	2		2,97 €	5,94 €
5493143	BETMIGA 50 MG 30 COMP. LIB. PROL.	2		32,14 €	64,28 €
5432422	Candesartan + Hidroclorotiazida Ciclum 16 Mg + 12.5 Mg 56	3		3,57 €	10,71 €
3882081	CETIRIZINA ACTAVIS 10 MG 20 COMP. REVEST. POR PEL.	2		3,66 €	7,32 €
3030988	Concor Ic 2.5 Mg 30 Comp. Revest. Por Pel.	2		2,87 €	5,74 €
5451075	DESLOORATADINA FARMOZ 5 MG 20 COMP. REVEST. POR PE	4		1,48 €	5,92 €
8256727	DULCOGOTAS 30 ML	2		4,58 €	9,16 €
6312538	Esoxx One Sol Oral Saq Monod10mlx20	1		11,72 €	11,72 €
4113585	EXXIV 90 MG 28 COMP. REVEST. POR PEL.	3		20,50 €	61,50 €
8530733	FAKTU C/APLICADOR 50G POM	1		7,73 €	7,73 €
2908895	FINASTERIDA FARMOZ 5 MG COMPRIMIDOS REVESTIDOS 5	3		6,39 €	19,17 €
8592527	FUCIDINE CREME 15GR 2%	4		3,50 €	14,00 €
5405279	GINKGO BILOBA KRKA 40 MG 60 CÁPSULA	4		5,94 €	23,76 €
6764290	HYLO-COMOD 10ML	2		10,31 €	20,62 €
2438489	IMODIUM RAPID 2 MG 10 COMP. ORODISPERS.	2		5,72 €	11,44 €
8491431	KOMPENSAN S CX 60 COMP.	3		5,92 €	17,76 €
5185921	Levocetirizina Krka 5 Mg 21 Comp. Revest. Por Pel.	1		2,48 €	2,48 €
6404483	Optrex Colírio Ag Hamamelis 10ml	2		7,69 €	15,38 €
5039649	PANTOC 20 MG 56 COMP. GASTRORRESISTENTE	2		12,22 €	24,44 €

[Doc. processado por Computador]

[Sobre Licença de SoftReis - Informática, Unipessoal, Lda.] (3981)

[SPharm v4.57.1t]

(Mod. ENC001)

Página 1 de 2

## Anexo 2: Receção de Encomenda

L.M.P.Q.F. Suc.COIMBRA (NIF: 600019675)

sexta-feira, 9 de Março de 2018

### Receção de Encomenda Nº: 6910

Fornecedor: Empifarma (22100294)		Operador: ESTAGIÁRIA FARM1		Moeda					
Data Receção: 09-03-2018 15:48:13		Doc. Fornecedor: Factura 621343		09-03-2018 Euro					
Código	Nome Comercial	Enc	Rec	Bon	IVA	Val.	P.V.P.	P.V.F.	Valor
6466797	DUCRAY KELUAL EMULSAO50ML		2	0	23%	06-2020	12,18 €	7,13 €	14,26 €
4361788	VISACOR 10 MG 10 MG 60 COMP. REVEST. POR PE		2	0	6%	05-2020	42,11 €	31,67 €	63,34 €

Taxa	Cálculos SPharm			Documento Fornecedor		
	Incidência	IVA	Total	Incidência	IVA	Total
6%	63,34 €	3,80 €	67,14 €	63,33 €	3,80 €	67,13 €
23%	14,26 €	3,28 €	17,54 €	14,25 €	3,28 €	17,53 €
<b>Total</b>	<b>77,60 €</b>	<b>7,08 €</b>	<b>84,68 €</b>	<b>77,58 €</b>	<b>7,08 €</b>	<b>84,66 €</b>

## Anexo 3: Nota de Devolução

L.M.P.Q.F. Suc.COIMBRA

De:  
 Direção Técnica: Dr. Paulo César E. Santos  
 L.M.P.Q.F. Suc. Coimbra  
 3000-237 COIMBRA  
 Telef.: 239 701772  
 Fax : 239 780892  
 N.º. Contribuinte : 600019675  
 C.R.C. 99001  
 Matrícula N.º. 99001  
 Capital Social

### Nota de Devolução Nº:71828/31

(Triplificado)

Código AT: 6262736070

Exmo(s) Sr(s):

**COOPROFAR**

Z.I. PORTELINHA - RUA PEDRO J. FERREIRA, 200/210

GONDOMAR


GONDOMAR

4429-209 GONDOMAR

N.º. Contribuinte 500 336 512

Data: 12-03-2018 11:18:01 V/Doc.:

Código	Nome Comercial	Validade	Qtd	Bon	IVA	P.V.P.	P.V.F.	Valor
<b>Retirado Mercad</b>								
5667027	Tramadol + Paracetamol Krka 75 Mg + 65		2	0	6%	7,89 €	5,84 €	11,68 €
<b>Documento Origem:</b> Factura F /F16018144 // 15-11-2016								
			2					11,68 €
Carga . . . : L.M.P.Q.F. Suc. Coimbra		3000-237 COIMBRA	Data: 12-03-2018		Hora: 11:47		Viatura:	
Descarga : Z.I. PORTELINHA - RUA PEDRO J. FERREI		4429-209 GONDOMAR	Data:		Hora:		00-00-01	
RETIRADO DO MERCADO								

*Anexo Mercado*  
  
 12-03-2018

Resumo de Totais por IVAS			
Taxa	Incidência	I.V.A.	TOTAIS
6,0%	11,68 €	0,70 €	12,38 €
	11,68 €	0,70 €	12,38 €

MF9v-Processado por programa certificado n.º478/AT  
 [Sobre Licença de SoftReis - Informática, Unipessoal, Lda.] [3981]

[SPharm v4.48.5s]

(Mod. DV001)

Este documento não serve de factura

Página 1 de 1