



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia de Jesus Mergulhão

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alcalóides Pirrolizidínicos: uma revisão sobre a problemática de que apenas o futuro dirá a dimensão” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob orientação da Dr.^a Cláudia Silvestre e do Professor Doutor Carlos Cavaleiro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Ana Sofia de Jesus Mergulhão

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alcalóides Pirrolizidínicos: uma revisão sobre a problemática de que apenas o futuro dirá a dimensão” referentes à Unidade Curricular “Estágio” sob orientação da Dr.^a Cláudia Silvestre e do Professor Doutor Carlos Cavaleiro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Julho de 2020

Eu, Ana Sofia de Jesus Mergulhão, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2014214169, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Alcalóides Pirrolizidínicos: uma revisão sobre a problemática de que apenas o futuro dirá a dimensão” 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, 15 de julho de 2020.

Ana Sofia de Jesus Mergulhão

(Ana Sofia de Jesus Mergulhão)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e à minha irmã por estarem ao meu lado neste percurso, pelas oportunidades que me deram e por, mesmo nem sempre concordando com as minhas escolhas, me terem deixado correr atrás do que acreditava.

À minha avó Adélia e ao meu avô João por moverem mundos e fundos por mim, porque esta vitória é tão minha como é deles. Houvesse no mundo palavras para lhes conseguir agradecer, para que nunca se esquecessem do que significam para mim.

À Mariana, ao Chico, ao Luciano e à Maria, por mais de uma década a serem ombros que me amparam as quedas, pelos segredos partilhados e pelo livro de histórias que já temos.

À Margarida, porque com ela todas as vitórias foram a dobrar. Voltasse eu 6 anos atrás e continuaria a escolher a que nunca pensou que a escolhesse.

À Daniela e à Kelly, pelas melhores histórias de comédia nos últimos meses, por contribuírem para a minha “serenidade” e pelos melhores (e maiores) jantares “italianos”. À Ana Sara, por nunca ter arredado pé nos momentos mais difíceis e pela alegria que só ela sabe trazer.

À Patrícia, pelos dias ainda mais bonitos que sabemos que estão por vir.

À Joana, a quem prometo ter, para sempre, uma janela ao sol e “coisas inteligentes” para partilhar.

À Cátia, pela capacidade admirável de quase me tirar do sério, mas por ser a prova de que a amizade vence toda a teimosia.

Ao Professor Doutor Carlos Cavaleiro, um mentor ao longo de vários meses, a quem estou extremamente grata por todas as oportunidades e pela preocupação demonstrada.

À “pequena família feliz” que ganhei na Farmácia de Celas, que, em tempos de incerteza, tornou os bons momentos certos.

A quem se cruzou comigo, caído de paraquedas, e me ensinou a perder o medo (ou “respeito”) das alturas e a não desistir de lutar por voos mais altos.

E finalmente a ti, Coimbra, por grande parte destas pessoas, pelas que vindas de trás, se mantiveram perto, pelas que, de passagem, me encheram de lições mas, principalmente, por não me teres deixado ir embora sem aprender a gostar verdadeiramente de ti.

INDÍCE

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

ABREVIATURAS	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. ANÁLISE SWOT	9
2.1. PONTOS FORTES (STRENGTHS)	9
2.1.1. Localização.....	9
2.1.2. Plano de Estágio: do <i>Back-Office</i> ao Atendimento	10
2.1.3. Metodologia <i>Kaizen</i> : mudança (“ <i>Kai</i> ”) para melhor (“ <i>Zen</i> ”).....	11
2.1.4. Profissionalismo da Equipa	12
2.1.5. Prestação de Serviços.....	13
2.1.6. Preparação de Medicamentos Manipulados	13
2.2. PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)	15
2.2.1. Atendimento ao Balcão	15
2.2.2. Limitação no Tipo de Atendimento	15
2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)	17
2.3.1. Novo Módulo de Atendimento.....	17
2.3.2. Formação Complementar	17
2.3.3. Estratégias de Dinamização: dos Cartazes à Loja <i>Online</i>	18
2.4. AMEAÇAS (THREATS)	19
2.4.1. Medicamentos Esgotados	19
2.4.2. Diversidade de Fontes de Informação.....	19
2.4.3. Facilidade de obtenção de produtos fora da farmácia	20
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

PARTE II - Monografia

RESUMO	24
ABSTRACT	25
ABREVIATURAS	26
1. INTRODUÇÃO	27
2. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS	28
2.1. OCORRÊNCIA BOTÂNICA	28
2.1.1. Características Estruturais.....	28
2.1.2. Biossíntese	31
2.2. TOXICINÉTICA	33

2.3. ASPETOS TOXICOLÓGICOS	35
2.3.1. Intoxicações Agudas e Crônicas.....	35
2.3.2. Genotoxicidade e Carcinogenicidade	36
2.3.3. Outros Tipos de Toxicidade	37
2.3.4. Fatores Influenciadores do Perfil Toxicológico.....	37
3. A PROBLEMÁTICA DA CONTAMINAÇÃO	39
3.1. CONSUMO HUMANO E ANIMAL	40
3.1.1. Fontes de Contaminação.....	41
3.1.2. Rações.....	42
3.2. CONTEXTO REGULAMENTAR	43
3.2.1. Limites	43
3.2.2. Estratégias de Gestão de Risco	44
4. MÉTODOS ANALÍTICOS	46
4.1. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	46
4.2. ANÁLISE	48
5. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	56

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia de Celas

Coimbra

ABREVIATURAS

INFARMED, I.P. – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. INTRODUÇÃO

Genchi Genbutsu É fácil perceber que para se entender a verdadeira essência de um problema, não há nada melhor que experienciá-lo. As soluções mais eficazes são aquelas que são baseadas na própria experiência, em que fomos à origem procurar os factos que nos permitem tomar as decisões mais acertadas. Este é o significado da expressão japonesa *genchi genbutsu*, “vai e vê por ti mesmo”, um pilar central de grandes empresas e, na minha opinião, a expressão que melhor descreve o objetivo do Estágio Curricular em Farmácia Comunitária, realizado no 5º ano do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

Para muitos de nós, estudantes do MICF, este Estágio Curricular representa o primeiro contacto com a realidade de uma farmácia comunitária. Esta realidade nem sempre está de acordo com as ideias pré-definidas, implementadas, ainda, na sociedade, daí a importância do carácter obrigatório desta unidade curricular. Apesar das mais diversas áreas em que o farmacêutico pode atuar, todas visam a melhoria e resolução de problemas de saúde pública, usando, na sua maioria, farmácias comunitárias como meio para chegar à população. Deste facto retira-se a importância de ir à origem, perceber o que falha, para assim encontrar as soluções adequadas aos problemas encontrados, ou seja, perceber toda a logística de uma farmácia, acrescenta conhecimento indispensável ao futuro farmacêutico, seja qual for a área em que irá, mais tarde, atuar. Um farmacêutico comunitário está habilitado para bem mais do que meramente vender medicamentos. Apesar de o fazer, nunca será apenas um simples ato de venda. A dispensa do produto será sempre acompanhada de um aconselhamento de excelência por parte de um profissional altamente qualificado, que mais do que isso é, muitas vezes, um amigo e esta versatilidade do farmacêutico é inconfundível.

Num ano que se tem revelado atípico, vivenciei ao longo do meu estágio em farmácia comunitária situações que me permitiram perceber melhor a base de muitos problemas, participei na procura de soluções e pude ainda celebrar a resolução de algumas dificuldades. Tive a oportunidade de pôr em prática conhecimentos adquiridos ao longo de quase cinco anos e desenvolver novas capacidades inerentes ao papel exemplar do farmacêutico na comunidade. A realização deste estágio na Farmácia de Celas, em Coimbra, sob orientação da Dr.ª Cláudia Silvestre, proporcionou-me a oportunidade de ter como exemplo uma equipa extremamente profissional, capaz de me dar a melhor formação, sem nunca deixar de lado a vertente humana.

O presente relatório foi redigido de modo a descrever conhecimentos adquiridos durante o estágio realizado na Farmácia de Celas, iniciado a 6 de janeiro de 2020, através de uma análise SWOT, referindo os pontos fortes (*Strengths*), pontos fracos (*Weaknesses*), oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*).

2. ANÁLISE SWOT

2.1. PONTOS FORTES (STRENGTHS)

2.1.1. Localização

A Farmácia de Celas, fundada em 1957, inicialmente designada “Farmácia Montes Claros” e localizada na Rua António José D’Almeida, situa-se atualmente na Estrada de Coselhas, junto às Circulares Externa e Interna (vias de acesso ao Hospital CHUC, Pediátrico e Idealmed). O parque de estacionamento em frente ou, alternativamente, na rua lateral da farmácia, facilita o acesso à Farmácia de Celas¹.

A localização e a facilidade de acesso são duas constantes no que diz respeito às razões pelas quais novos utentes se dirigem à Farmácia de Celas, não tendo sido raro ouvir alguns destes utentes dizer que tinham acabado de sair dos hospitais e foi a primeira farmácia que viram e em que poderiam facilmente estacionar, durante o meu estágio. Estes factos fazem com que a imagem clássica que associamos a grande parte das farmácias, cuja maioria dos utentes são utentes habituais, não seja a adequada para retratar a realidade da Farmácia de Celas. Apesar de também os ter, a grande maioria são utentes que, como os próprios referem, “estão de passagem”, oriundos dos vários cantos do país, o que embora represente problemas para questões de fidelização, foram fatores que fizeram do meu estágio um estágio mais completo. A diversidade de utentes fez com que me deparasse com uma diversidade igual de situações, permitindo-me aplicar conhecimentos das mais distintas áreas.

Mais do que a aprendizagem prática de conhecimento científico, foi necessário desenvolver capacidades comunicativas e sociais. É de extrema importância moldar o atendimento à personalidade de quem tentamos ajudar. O facto de todos os dias me ter cruzado com utentes novos, sobre os quais não tinha qualquer informação, ensinou-me a moldar o atendimento com base em pormenores e perguntas-chave que fui aprendendo com a equipa da Farmácia de Celas. A mesma abordagem perante duas pessoas diferentes não é a postura mais correta, podendo dificultar a comunicação com o utente e representar mais um obstáculo à fidelização. Desde o início que fui aconselhada a assistir aos atendimentos e, assim, rapidamente me apercebi que não existe uma regra universal para um bom atendimento. Apercebi-me também da verdadeira importância de fazer as perguntas certas: perguntas-chave levam-nos à obtenção de respostas que vão orientar o nosso atendimento e permitir o correto entendimento das necessidades do utente. Um exemplo desta questão é o aconselhamento de produtos cosméticos, em que certas respostas permitem-nos posicionar o utente perante

as várias marcas e ganhar a confiança do mesmo pois soubemos ir ao encontro das suas necessidades.

A heterogeneidade de utentes com que diariamente me cruzei fez com que desenvolvesse uma grande capacidade de adaptação, algo que acredito que me permitirá estar mais bem preparada para situações futuras, quer seja no contexto de uma farmácia comunitária, quer seja em qualquer outro ramo de trabalho.

2.1.2. Plano de Estágio: do *Back-Office* ao Atendimento

O principal foco da Farmácia de Celas é tornar-se uma referência nos serviços que oferece de modo a que possa contribuir para o bem-estar da comunidade. Para que isto aconteça e para que seja possível um atendimento de excelência, existe uma série de passos que precede este ato, necessária à garantia da sua qualidade.

A estrutura faseada do meu estágio permitiu-me perceber a importância de cada uma das etapas e proporcionou um crescimento e ganho de confiança gradual. Numa primeira fase, as tarefas consistiram na realização de tarefas como receção de encomendas, familiarização com os produtos disponíveis na farmácia e arrumação dos mesmos, logística interna e introdução às funcionalidades do sistema informático, que no caso da Farmácia de Celas apresenta a versão SIFARMA2000® e o Novo Módulo de Atendimento. Foram-me introduzidos alguns conceitos de gestão, de extrema importância na estabilidade de uma farmácia e que a Dr.^a Cláudia não quis deixar passar despercebidos ao longo do estágio. Estes conceitos tornaram possível um entendimento mais fácil e rápido das repercussões de erros cometidos em etapas iniciais, como receção de encomendas, e a importância destas etapas.

Após esta fase introdutória, essencialmente de *back-office*, fui começando a assistir mais de perto aos atendimentos e a realizar alguns, acompanhada por uma das farmacêuticas da equipa. Com o tempo e também com a grande afluência à farmácia que assim o exigia, comecei a realizar os primeiros atendimentos sozinha, num balcão perto de elementos mais experientes que me poderiam auxiliar quase imediatamente em situações de dúvida.

A estrutura do estágio representou uma enorme ajuda na adaptação ao ambiente profissional. O ato de atender ao balcão, não sendo de maior ou menor importância que as restantes tarefas, representa uma enorme responsabilidade por ser necessário demonstrar a maior confiança a quem está do outro lado do balcão. No entanto, esta confiança só é conseguida se for precedida de passos de preparação que ocorrem no *back-office*.

2.1.3. Metodologia *Kaizen*: mudança (“*Kai*”) para melhor (“*Zen*”)

A realidade a que nos continuamos a adaptar exige, talvez mais do que nunca, um pensamento direcionado para a resolução de problemas que resulte no mínimo de desperdícios e em soluções cada vez mais eficientes. A essência da melhoria contínua é representada pelo conceito que dá nome a este ponto, *Kaisen*, uma filosofia japonesa implementada em empresas das mais diversas áreas², entre as quais farmácias, como a Farmácia de Celas. Estas apresentam como foco comum a otimização dos processos que o seu funcionamento envolve e têm na lista de preocupações diárias elevar a produtividade e rentabilidade, enquanto são reduzidos e/ou eliminados desperdícios.

Um dos princípios da metodologia *Kaisen* é dar a todos os elementos da equipa a oportunidade para participar na resolução de problemas³. A realização de reuniões diárias de curta duração é uma das estratégias que a Farmácia de Celas tem implementadas para que este princípio seja respeitado. Estas reuniões representam o momento em que é feito um ponto da situação relativamente às tarefas de cada um, em que são discutidas as falhas e definidos novos objetivos e estratégias. Cada tarefa, por mais pequena que pareça, pode influenciar toda a equipa, o que torna essencial um elevado nível de organização para que nenhuma tarefa seja esquecida ou, pelo contrário, duplicada. Para além de dinamizar a comunicação entre a equipa, esta “pausa” na realização de tarefas assume um papel importante no desenvolvimento do sentido de responsabilidade de cada um, algo que contribui a interiorização do conceito de melhoria contínua também a um nível individual.

Esta ideologia japonesa não está apenas implementada na maneira de pensar e trabalhar de cada elemento da Farmácia de Celas, materializa-se também em vários setores e tarefas, adaptados de acordo com as necessidades. Serve de exemplo a metodologia aplicada na arrumação de medicamentos, que, após dada a sua receção no sistema informático, são primeiramente dispostos num carrinho de acordo com a forma farmacêutica e, preferencialmente, por ordem alfabética. Após a confirmação desta mesma encomenda, são arrumados em espaços definidos. Existem espaços destinados a aerossóis, colírios, comprimidos e cápsulas, pomadas e cremes, injetáveis, xaropes, entre outros, organizados por ordem alfabética, de modo a facilitar a procura durante os atendimentos. Para que o tempo de procura e recolha dos medicamentos seja ainda menor, existe um conjunto de gavetas próximo de cada um dos dois conjuntos de balcões destinados ao atendimento onde se encontram os medicamentos de maior rotação na farmácia, denominado *cockpit*. Durante o meu estágio pude participar na análise das vendas destes medicamentos, da qual resultaram alterações uma vez que alguns dos medicamentos dispostos no *cockpit* já não representavam

medicamentos de maior rotação. Após esta análise foram criadas tabelas, organizadas por gavetas do *cockpit* e por disposição dos medicamentos nas mesmas onde existem espaços destinados ao registo das faltas com o objetivo de facilitar a sua reposição. A existência de uma zona onde estão afixadas campanhas e outras atividades que possam estar a decorrer na farmácia, eventos futuros, tarefas a realizar por cada elemento da equipa, objetivos e parâmetros a avaliar num determinado período de tempo e outras informações às quais devemos estar atentos diariamente ao chegar à farmácia, assim como um quadro destinado a todo o tipo de comunicações representam outros exemplos da materialização da metodologia *Kaisen* e que se revelam peças-chave nas reuniões referidas anteriormente.

Os exemplos apresentados demonstram como muitas vezes são necessários poucos ou nenhuns recursos para originar melhorias significativas no desempenho da equipa e, consequentemente da farmácia. Participar nas reuniões e aplicar na prática esta ideologia fez com que criasse linhas de pensamento e organização de trabalho diferentes enquanto desenvolvia um pensamento mais estratégico, cujo foco é a procura constante de melhores soluções, mais adaptadas ao contexto atual. Apesar dos trabalhos de grupo que são desenvolvidos ao longo do curso, considero que as tarefas que realizei em equipa ao longo do estágio, assim como as preocupações a que estou agora mais atenta, apresentam uma maior complexidade à qual está associado um sentido de responsabilidade maior. Acredito que estas são ferramentas que me permitirão uma integração mais fácil e um melhor desempenho em qualquer equipa que integre.

2.1.4. Profissionalismo da Equipa

Algo que é impossível ignorar ao entrar na Farmácia de Celas é o profissionalismo da equipa, profissionalismo este que contribuiu não só para o meu rigor enquanto futura profissional de saúde, mas também para o meu crescimento pessoal.

A este profissionalismo está associado um grande sentido de responsabilidade que me foi inculcado desde o primeiro dia. Ao ser totalmente integrada na equipa, integração facilitada pela boa disposição que reinou ao longo de todo o estágio, cada falha minha iria ter repercussões no trabalho do resto da equipa. Assim, tal como cada boa ideia e decisão acertadas foram elogiadas, também as falhas foram apontadas e explicadas, porque mais importante do que saber qual é o erro, é preciso percebê-lo. Estas críticas construtivas são fundamentais naquele que, para muitos de nós, é o primeiro contacto com o mundo profissional. Como “caloiros” deste mundo, não sabemos tudo e nem sempre estamos certos, saber aceitar as críticas e usá-las como ferramenta para crescer enquanto profissional e pessoa

foi algo que pude desenvolver ao longo dos últimos meses e que agradeço à exigência tanto da Dr.^a Cláudia Silvestre, como da restante equipa.

Mais do que alguém capaz de dominar o conhecimento do medicamento, o farmacêutico é frequentemente o primeiro amigo a prestar soluções para os problemas da população e a nossa postura perante o utente vai determinar a confiança que vão depositar em nós. Não temos uma segunda oportunidade de criar uma boa primeira impressão e isto é especialmente importante numa farmácia em que muitos dos utentes estão “de passagem” e uma boa primeira impressão pode ser o motivo necessário para uma segunda visita. Este aspeto não foi nunca descurado do meu estágio e tive, sem dúvida, os melhores exemplos de uma equipa que prima pela simpatia, rigor e atenção com todos os seus utentes.

2.1.5. Prestação de Serviços

A Farmácia de Celas é mais do que um sítio de dispensa de medicamentos e aconselhamento de qualidade. É também um local que oferece um conjunto de serviços que visa a melhoria da qualidade de vida dos seus utentes. Entre estes serviços estão consultas de nutrição, consultas de podologia, fotodepilação e outros tratamentos dermocosméticos, medição da tensão arterial e de parâmetros bioquímicos (glicémia, colesterol, triglicéridos) e ainda administração de vacinas e preparação de medicamentos manipulados. Destaco a presença semanal de uma nutricionista que permite, também, que possam ser esclarecidas dúvidas relativamente a produtos de auxílio à perda de peso, por exemplo, que acabam por ser bastante procurados.

Esta variedade de serviços dá uma dinâmica característica à Farmácia de Celas, fideliza utentes e permite aos estagiários entrar em contacto com áreas também exploradas no MICEF, como a área da nutrição.

2.1.6. Preparação de Medicamentos Manipulados

Apesar de cada vez menos comum, a preparação de medicamentos manipulados é outros dos serviços que a Farmácia de Celas oferece aos seus utentes e que ainda apresenta um número considerável de pedidos. Estes são requisitados quando se pretende ajustar a composição (qualitativa e quantitativa) ao perfil do doente, considerando-se assim uma terapêutica individualizada. O facto de estarmos perante uma constante evolução na indústria, aumenta a variedade de formulações e formas farmacêuticas disponíveis no mercado, o que leva a que cada vez menos se recorra à preparação de medicamentos manipulados.

O facto de a Farmácia de Celas dispor deste serviço, permitiu-me participar nesta tarefa e aplicar conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo do curso. Destaco a preparação de uma suspensão oral de propanolol a 5% para uso pediátrico. Após a confirmação dos cálculos correspondentes à preparação em questão, para que seja verificada a segurança relativamente às doses, todos os passos do procedimento, realizados de acordo com as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados requeridas pelo INFARMED, I.P. que visam a elevada qualidade destes medicamentos (Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho), foram explicados, não só durante a preparação do medicamento manipulado em si, mas também no, não menos importante, preenchimento da sua folha de preparação com dados relativos ao doente, ao prescritor, a matérias-primas e respetivas quantidades e números de lote, ao modo de preparação, características organolépticas, prazo de utilização, condições de armazenamento e cálculo do preço de venda. Esta ficha tem de ser rubricada e datada por quem preparou o medicamento e por quem supervisionou esta preparação.

A forte componente prática ao longo do MICF facilita a realização deste tipo de preparações que demonstram a versatilidade da classe farmacêutica.

2.2. PONTOS FRACOS (WEAKNESSES)

2.2.1. Atendimento ao Balcão

A passagem do *back-office* para o atendimento ao balcão foi talvez a etapa que mais à prova me pôs. Com o primeiro atendimento surge o medo de falhar e o sentido de responsabilidade sobe exponencialmente. Numa farmácia em que a qualidade do atendimento é sem dúvida dos pontos fortes, o medo de ficar aquém acrescentou algum nervosismo que inicialmente não me permitia ter um atendimento fluido nem demonstrar a maior confiança. De notar a importância da equipa da Farmácia de Celas nesta transição, pela confiança que depositou em mim, que me permitiu tornar cada vez mais autónoma, pela preparação prévia e pela constante ajuda, nunca me tendo deixado desamparada. Esta preparação consistiu em casos práticos simulados e na disponibilização de vários materiais que fui sempre aconselhada a ler.

O facto de estar um pouco formatada para os nomes de princípios ativos foi outro obstáculo com que me deparei. A associação dos nomes comerciais dos medicamentos à substância ativa dificultou alguns atendimentos, que complicavam quando a única referência que o utente dava era a cor da caixa. Este último aspeto tornou notória a importância da fidelização do utente, pois o registo da sua compra permitiria facilmente identificar, através do histórico, qual a terapêutica habitual. Estes dois pontos justificam também a importância de começar pelo *back-office* e a insistência da equipa para que percebesse a organização da farmácia, que está bem definida e é modificada de acordo com as necessidades, para além do conhecimento das opções de que a Farmácia de Celas dispõe.

2.2.2. Limitação no Tipo de Atendimento

Apesar de o primeiro caso de COVID-19 ter chegado a Portugal em março, as preocupações da população começaram a surgir ainda em janeiro, começando a recorrer às farmácias para garantir (muitas vezes em quantidades excessivas) máscaras, álcool-gel, vitamina C, ibuprofeno e paracetamol. A maior afluência à Farmácia de Celas não representou uma maior heterogeneidade de casos, antes pelo contrário, quase de um dia para o outro, as restantes preocupações pareciam ter desaparecido. Grande parte dos atendimentos resumiam-se à venda dos produtos referidos anteriormente, algo que não permitiu explorar por completo a heterogeneidade característica do grupo de utentes da Farmácia de Celas durante os primeiros meses de estágio.

O período após o estado de emergência representou também alguns pontos negativos. A diminuição drástica no número de utentes que se dirigiam à farmácia (justificada não só pelo

medo, mas pelo facto de ter sido levantada medicação para longos períodos de tempo durante os meses de fevereiro e março) e a limitação dos balcões disponíveis para atendimento de modo a garantir a distância de segurança, associado a uma interrupção do estágio de cerca de um mês foram obstáculos com que me deparei ao retomar à Farmácia de Celas.

Apesar das dificuldades, são estas situações que mostram a capacidade de resiliência das equipas, teste que a equipa da Farmácia de Celas superou, sem nunca perder a boa-disposição e arranjando estratégias para dinamizar a farmácia e a equipa.

2.3. OPORTUNIDADES (OPPORTUNITIES)

2.3.1. Novo Módulo de Atendimento

Uma das grandes oportunidades do meu estágio foi, sem dúvida, poder ter contactado com o novo sistema informático Novo Módulo de Atendimento, ferramenta que não se encontra, para já, disponível em todas as farmácias. O facto de ter trabalhado com ambas as versões do sistema informático utilizadas na Farmácia de Celas (SIFARMA2000® e Novo Módulo de Atendimento) constitui um aspeto diferenciador do meu estágio, marcando-o muito pela positiva. Mesmo existindo algumas dificuldades iniciais em aprender e dominar todas as funcionalidades das duas versões em simultâneo, o facto de serem ambas novidade fez com que não estivesse “presa” a hábitos antigos ou funções memorizadas, encarando inicialmente cada uma quase como uma ferramenta diferente. Numa fase posterior já possuía domínio suficiente para conseguir interligar as funções dos dois sistemas.

Apesar das falhas informáticas que obrigavam, muitas vezes, a reiniciar o atendimento, pude acompanhar de perto as melhorias que iam sendo feitas ao sistema, contribuir com sugestões e esclarecer dúvidas durante as visitas frequentes da Glintt Farma, responsável pela manutenção do sistema.

2.3.2. Formação Complementar

A evolução da Indústria Farmacêutica faz com que seja necessário um acompanhamento constante das novidades existentes no mercado, uma vez que com o aparecimento, cada vez mais rápido, de novas soluções é importante o farmacêutico manter-se atualizado de modo a poder sugerir as melhores opções para as necessidades dos seus utentes, resultando numa maior satisfação do doente. É nesta atualização que as visitas de delegados de diferentes laboratórios desempenham um papel de extrema importância por não só informarem que existem novidades no mercado, mas por explicarem o mecanismo de ação e outras características inerentes ao medicamento novo. Daí a importância da aquisição contínua de novo conhecimento, oportunidade que tive ao longo dos meses do meu estágio.

Estas formações, embora em menor número que o habitual devido à limitação da realização de eventos, deram-me a possibilidade de assistir a lançamentos de novos produtos de marcas como Lierac, Jowaé, Phyto e Skinceuticals e de poder participar em formações no âmbito da COVID-19, mesmo antes da sua chegada a Portugal.

Não só em formações externas pude beneficiar desta formação complementar. Diversas marcas de produtos dermocosméticos fazem aconselhamentos nas farmácias e estas visitas permitiram-me conhecer melhor as particularidades de cada uma e esclarecer possíveis

dúvidas, algo extremamente útil pois com a diversidade de opções de que a Farmácia de Celas dispõe, é necessário ter algum domínio das mesmas para conseguir demonstrar confiança ao utente, resultando num melhor atendimento.

2.3.3. Estratégias de Dinamização: dos Cartazes à Loja Online

Como elemento completamente integrado, pude participar na sugestão de estratégias para dinamizar a farmácia. O espírito empreendedor e inovador da Dr.^a Cláudia faz com que a farmácia esteja em constante adaptação ao mundo atual, inovando nas mais diversas vertentes, desde a apresentação dos lineares, à realização de cartazes apelativos e à dinamização das redes sociais como estratégia de aproximação à comunidade.

Tal como em qualquer outro lugar, o aspeto visual de uma farmácia também é importante. A disposição dos produtos e a existência de elementos visuais apelativos, que dirijam o foco para determinados produtos, foram aspetos cuja importância, embora já conhecida, fui verificando ao longo do estágio, possibilitando, muitas vezes, vendas cruzadas.

Tive oportunidade de criar diversos cartazes e publicações para redes sociais e destas tarefas retiro ensinamentos também na área do *marketing*, referidos durante as discussões de ideias e que eram fundamentais para entender os objetivos de cada cartaz ou publicação.

De modo a aproveitar as funcionalidades do Novo Módulo de Atendimento, participei ainda no desenvolvimento de uma *newsletter*, para que sejam divulgadas campanhas, promoções, conselhos e notícias de uma forma mais direta ao utente, surgindo assim mais uma ferramenta de adaptação ao mundo digital e aproximação ao utente da Farmácia de Celas.

A criatividade desempenha um papel relevante numa farmácia uma vez que tem de se adaptar constantemente às novas necessidades dos utentes e às ameaças externas, de modo a conseguir apresentar soluções adaptadas a essas novas realidades. O facto de ter estagiado numa farmácia focada na melhoria contínua e de ter participado em todas as tarefas realizadas permitiu-me desenvolver novas capacidades de resolução de problemas, tornando-me mais ágil a apresentar possíveis soluções.

2.4. AMEAÇAS (THREATS)

2.4.1. Medicamentos Esgotados

Bem antes do pico de afluência da população à farmácia, um problema com que rapidamente contatei foi o facto da existência de medicamentos esgotados nos diferentes fornecedores. Aconteceu ao atender, por vezes, não conseguir disponibilizar ao utente o medicamento em questão dado que se encontrava nesta situação. Esta, nem sempre, é uma problemática de fácil resolução, principalmente quando se trata de medicação habitual. O facto de nem todos os utentes aceitarem alternativas (quando existem), devido frequentemente à desconfiança pelos medicamentos genéricos, constitui um problema para o utente, que não consegue ver satisfeitas as suas necessidades, mas também para a farmácia que nem sempre tem a possibilidade de apresentar soluções. Isto representa uma ameaça considerável, principalmente em farmácias como a Farmácia de Celas, com muitos utentes “de passagem”. O facto de não conseguir dispensar um determinado medicamento solicitado por um utente, pode criar nele, consciente ou inconscientemente, a imagem errada da farmácia, por razões que a ultrapassam. Esta situação foi agravada, principalmente, no mês de março, em que o número de vendas de determinados medicamentos aumentou exponencialmente, consequência do pânico instalado pela situação nova para a qual nos estávamos a preparar, a chegada iminente de COVID-19 a Portugal.

De modo a tentar contornar, em parte, este problema, sempre que possível fui aconselhada a verificar a disponibilidade destes medicamentos esgotados nos fornecedores da Farmácia de Celas, tarefa realizada pelo menos uma vez por dia. Esta preocupação constante demonstra, mais uma vez, o profissionalismo da equipa que me recebeu, cuja dedicação e preocupação constante com o bem-estar da comunidade é impossível negar.

2.4.2. Diversidade de Fontes de Informação

A velocidade a que uma informação errada circula foi ainda mais notória nos últimos meses. Ao Dr. *Google*, associou-se o Dr. *Facebook*, Dr. *WhatsApp* e os já conhecidos “conselhos dos vizinhos e amigos”, que são sempre infalíveis para quem os recebe. Estas fontes estiveram na base do pânico implementado durante os primeiros meses do meu estágio.

O facto de um vírus ter trazido consigo uma realidade nova, em que todos os dias eram divulgadas informações diferentes, por vezes até contraditórias, não contribuiu para o combate a este problema. O pânico gerou uma enorme afluência à farmácia, esgotando, rápida e desnecessariamente, *stocks* de diversos produtos, uma vez que a produção e a disponibilidade dos mesmos nunca estiveram comprometidas. Mesmo com a passagem desta informação aos

utentes por parte da equipa da Farmácia de Celas, verifiquei que o peso de notícias das redes sociais e de informações sem qualquer base científica foi, muitas vezes, superior à informação disponibilizada por profissionais de saúde altamente qualificados. Não por falta de confiança nestes, mas por acreditarem que as restantes informações também poderiam estar certas, então mais valia prevenir.

Estas situações podem, inevitavelmente, representar um perigo de dimensão catastrófica para a saúde pública. O facto de cada vez mais a informação estar apenas a um clique de distância, não apresenta só vantagens. A facilidade com que é publicado conteúdo faz com que seja necessária uma capacidade de filtragem superior, de modo a distinguir o que é verdadeiro, do que é falso. Acredito que o papel do farmacêutico é de extrema importância nesta ameaça, uma vez que através do contacto direto com o utente pode contribuir no desenvolvimento de ferramentas capazes de ajudar na escolha das fontes de informação a que irá passar a recorrer.

2.4.3. Facilidade de obtenção de produtos fora da farmácia

Apesar de não representar das situações mais comuns, por vezes alguns utentes dirigem-se à farmácia à procura de conselhos, por exemplo relativamente a produtos dermocosméticos, no entanto, no final referem que conseguem obter os produtos noutros locais, como lojas *online*, por preços inferiores. O mesmo se aplica no caso de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM). A ideia de que as promoções e descontos em superfícies comerciais e lojas *online* fazem dos seus produtos, produtos mais baratos do que os produtos à venda numa farmácia nem sempre está correta, como pude várias vezes confirmar. No entanto, a facilidade na obtenção de produtos a partir de, mais uma vez, um simples clique, representa uma ameaça. Não ignorando estes fatores, a Farmácia de Celas respondeu à situação através da criação de uma loja *online* na plataforma *Facebook*. Podem também ser realizados pedidos através do *e-mail* da farmácia, telefone e *WhatsApp*, disponibilizando diferentes formas de pagamento e entrega ao domicílio.

Torna-se importante reforçar a ideia de que a aquisição de produtos numa farmácia não é só uma compra, associado à aquisição do produto está um aconselhamento profissional, altamente qualificado e gratuito, que vai permitir o seu uso correto e em segurança, facilitando o alcance dos melhores resultados, algo difícil de obter em qualquer outra plataforma ou estabelecimento comercial.

Destaco, novamente, a criatividade e a versatilidade que os farmacêuticos necessitam de demonstrar na adaptação a novos problemas e ameaças.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde o primeiro dia do meu estágio que me foi dito que o meu percurso dependeria de mim, da minha vontade de aprender e da maneira como encarasse os desafios. Hoje, terminado o estágio, percebo o porquê. O empenho e a dedicação de toda a equipa para me proporcionar o melhor e mais completo estágio estiveram sempre presentes, assim, apenas o meu comportamento poderia ditar o resultado desta etapa do meu percurso académico.

Olhando para o dia 6 de janeiro de 2020, vejo o quão desfocada estava a minha imagem de uma farmácia comunitária. Agora, com uma visão mais clara, estou mais preparada para exercer também o meu papel na comunidade, ciente de que se avizinha ainda um longo caminho de aprendizagem, mas motivada para o percorrer.

A realização do estágio durante um período de pandemia fez-me ver de perto a verdadeira resiliência de um farmacêutico, a capacidade de adaptação ao caos, que algumas vezes se instalou. Mesmo em situações de cansaço extremo, o farmacêutico comunitário demonstra a verdadeira essência daquele que é um profissional de saúde cujo foco é o bem-estar do outro, é a capacidade de continuar à procura de soluções para problemas que teimam em surgir, enquanto mantém a simpatia e o sorriso para quem o procura.

Algo que ouvi durante este período e que foi impossível esquecer é que em tempos de crise, muitos choram e outros vendem lenços de papel. Aprendi neste estágio que quando os problemas surgem, não basta querer vender lenços de papel, tenho de saber vender os melhores lenços de papel sem nunca me esquecer dos conselhos de utilização.

Agradeço à Dr.^a Cláudia Silvestre, à Dr.^a Catarina, à Dr.^a Rita, à Cristina e à Isabel, por terem confiado em mim e me terem dado todas as ferramentas para concluir o meu estágio não só mais preparada para ser uma melhor profissional, mas também uma melhor pessoa, extremamente grata pelos valores e ensinamentos transmitidos ao longo de todo o estágio.

REFERÊNCIAS

1. Farmácia de Celas. Farmácia de Celas - Início. [Acedido a 23 de junho de 2020] Disponível em <https://www.farmaciadecelas.pt/>.
2. Toyota. Filosofia Toyota Way. [Acedido a 23 de junho de 2020] Disponível em <https://www.toyota.pt/world-of-toyota/toyota-no-mundo/the-toyota-way.json>.
3. Kanbanchi. What is Kaizen? [Acedido a 23 de junho de 2020] Disponível em <https://www.kanbanchi.com/what-is-kaizen>.

PARTE II

Monografia

**“Alcalóides Pirrolizidínicos:
uma revisão sobre a problemática de que apenas o futuro dirá a
dimensão”**

RESUMO

Os alcalóides pirrolizidínicos são metabolitos secundários, exclusivos de algumas espécies vegetais, na sua maioria plantas infestantes (ervas daninhas), cuja toxicidade, documentada e conhecida há várias décadas, é capaz de afetar desde a vida animal selvagem, ao Homem. Algumas espécies produtoras destas fitotoxinas podem ser usadas para fins medicinais ou na produção de medicamentos, no entanto a presença, já demonstrada, na cadeia alimentar, em quantidades superiores às esperadas e em todo o tipo de géneros alimentícios, justifica a preocupação crescente relativamente a esta contaminação. A diversidade estrutural destes compostos, aliada às variações com que ocorrem nas diferentes matrizes, dificultam a descrição de um método de análise comum. No entanto, em 2019 foi aberto para consulta pública um capítulo geral, especificamente destinado aos alcalóides pirrolizidínicos, a incluir pela primeira vez na Farmacopeia Europeia.

Torna-se relevante a partilha dos conhecimentos científicos já validados que, embora longe de serem suficientes para se conhecer a verdadeira dimensão da exposição a alcalóides pirrolizidínicos, são necessários a todos os que participam na garantia da segurança dos consumidores, entre os quais Farmacêuticos, para que possam constituir parte ativa na resolução desta problemática.

Palavras-chave: Alcalóides Pirrolizidínicos, Biossíntese, Toxicidade, Exposição Humana e Animal, Avaliação de Risco, Métodos de Análise.

ABSTRACT

Pyrrolizidine alkaloids are secondary metabolites, exclusive to some plant species, mostly weeds, whose toxicity, documented and known for several decades, is capable of affecting from wildlife to humans. Some species producing these phytotoxins can be used for medicinal purposes or in medicines' production, however, the presence, already demonstrated, in the food chain in higher quantities than expected and in all types of foodstuff, justifies the growing concern about this contamination. The structural diversity of these compounds, along with the variations with which they occur in the different matrices, make it difficult to describe a common method of analysis. However, in 2019 a general chapter specifically covering pyrrolizidine alkaloids was launched for public consultation and included, for the first time, in the European Pharmacopoeia.

It is important to share the scientific knowledge already validated which, even though is far from sufficient to understand the true extent of the exposure to pyrrolizidine alkaloids, is needed by all those involved in ensuring the safety of consumers, including Pharmacists, so that they can play an active role in addressing this issue.

Keywords: Pyrrolizidine alkaloids, Biosynthesis, Toxicity, Human and Animal Exposure, Risk Assessment, Methods of Analysis.

ABREVIATURAS

ALARA – Tão baixos quanto possível (*As low as reasonably achievable*)

APs – Alcalóides Pirrolizidínicos

BfR – Instituto Federal de Avaliação dos Riscos (*Bundesinstitut fuer Risikobewertung*)

CoP – Código de Práticas (*Code of Practice*)

CYP450 – Citocroma P450

DHP – Dihidronecinas

DHPA – Alcalóides Dihidropirrolizidina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EDQM – *European Directorate for the Quality of Medicines*

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority*)

EMA – Agência Europeia do Medicamento (*European Medicines Agency*)

FAO – Organização para a Alimentação e Agricultura (*Food and Agriculture Organization*)

FDA – Agência Americana para a Segurança Alimentar e do Medicamento (*Food and Drug Administration*)

FMOs – Monooxigenases que contêm Flavina (*Flavin-containing Monooxygenase*)

GACP – Boas Práticas Agrícolas e de Colheita (*Good Agricultural and Collection Practice*)

GC – Cromatografia de Fase Gasosa

GSH – Glutatião

HMP – Produtos Medicinais à Base de Plantas (*Herbal Medicinal Products*)

HMPC – Comité de Produtos Medicinais à Base de Plantas (*Herbal Medicinal Products Committee - EMA*)

HSOS – Síndrome de Obstrução Sinusoidal

HSS – Homospermidina Sintase

HVOD – Doença Venoso-oclusiva Hepática

IARC – Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Cancro (*International Agency for Research on Cancer*)

LC – MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa (*Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*)

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa Bidimensional (*Liquid Chromatography-tandem mass spectrometry*)

MS/MS – Espectrometria de Massa Bidimensional

OMS – Organização Mundial de Saúde

Painel CONTAM – Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar

PANO – N-óxidos de alcalóides pirrolizidínicos

PISQ – Programa Internacional de Segurança Química

SCX – Cromatografia de Forte Troca Iónica (*Strong Cation Exchange*)

SPE – Extração em Fase Sólida (*Solid Phase Extraction*)

SPME – Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

I. INTRODUÇÃO

Os alcalóides representam um grupo de compostos azotados que ocorrem em plantas, fungos e alguns microrganismos, dotados de atividade biológica e que, por isso medeiam, na natureza, diversas funções biológicas e ecofisiológicas¹. Quando presentes nas plantas, ocorrem sob a forma de sais de ácidos orgânicos ou em combinação com outros compostos, como os taninos¹. A maioria dos alcalóides apresenta propriedades básicas e carácter hidrofóbico, são solúveis em solventes orgânicos apolares e no álcool¹ e são dotados de atividades biológicas, alguns notabilizados pelo potencial toxicológico ou farmacológico¹.

Dentro das famílias de alcalóides conhecidas, os alcalóides pirrolizidínicos (APs) têm recebido atenção crescente nas últimas décadas devido ao seu potencial toxicológico^{1,2}. Centenas de APs estruturalmente distintos já foram identificados em milhares de espécies vegetais³. Muitas delas são plantas infestantes (ervas daninhas) que, ocorrendo em campos de cultivo, mesmo em baixa densidade, são capazes, por mecanismos fisiológicos, de transferir APs para as plantas da cultura, além de, por insuficiências de triagem nas fases de colheita e pós-colheita, poderem ser fonte de contaminação dos produtos da cultura. As maiores preocupações recaem sobre as contaminações de cereais e de matérias-primas vegetais usadas na produção de suplementos alimentares, de produtos medicinais à base de plantas e de outros produtos de fronteira³. A crescente sensibilização relativa à contaminação de alimentos e produtos medicinais por parte destes metabolitos secundários, em todo o tipo de géneros alimentícios justifica o interesse e preocupação em torno deste tema¹.

Com este trabalho, pretendemos reunir e sistematizar a informação relevante sobre alcalóides pirrolizidínicos, desde a sua natureza química, a ocorrência natural, a toxicidade, os fatores que contribuem para a exposição e para o risco, abordagens laboratoriais de despistagem e de quantificação, etc. Esta informação é da maior relevância para todos aqueles que contribuem para a segurança dos consumidores, em particular aos Farmacêuticos, agentes de primeira linha de saúde pública e atores fundamentais em setores de atividade onde esta problemática tem impactos significativos^{4,5}.

2. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Os alcalóides pirrolizidínicos são metabolitos azotados, exclusivos de algumas espécies vegetais^{3,6}, que resultam do catabolismo da *L*-arginina e da *L*-ornitina, assegurando uma forma de eliminação de azoto da célula vegetal^{7,8}. O sabor amargo⁹ e a toxicidade, sobretudo para os organismos superiores, conferem-lhes o papel ecofisiológico de dissuasores da predação por herbívoros^{7,10-12}.

2.1. OCORRÊNCIA BOTÂNICA

Cerca de 95% dos APs são encontrados em apenas cinco famílias de plantas: *Asteraceae*, *Boraginaceae*, *Fabaceae*, *Orchidaceae* e *Apocynaceae*^{8,13,14}. Presentes em mais de 6000 espécies distribuídas pelo mundo inteiro, maioritariamente plantas infestantes (ervas daninhas), algumas delas usadas para fins medicinais (Tabela I – Anexo)^{1,5,12,13,15,16}, outras para cobertura e melhoramento dos solos e até como plantas ornamentais, constituem provavelmente a toxina de origem natural mais amplamente distribuída, capaz de afetar desde a vida animal selvagem, à criação de gado e ao Homem^{13,16-18}.

O teor em alcalóides pirrolizidínicos não pode ser generalizado¹⁹. É dependente de fatores como a espécie, parte da planta, estação do ano, localização geográfica e ainda dos processos de colheita, armazenamento e extração^{8,9,13,19}. Estas toxinas estão maioritariamente produzidas nas raízes e depois concentradas nas sementes e partes floridas das plantas, em quantidades menores nas folhas, nos caules e nas raízes^{8,13}.

Algumas espécies produzem exclusivamente determinado(s) tipo(s) de APs, outras, a maioria, produzem misturas de APs de vários tipos, num intervalo de menos de 0,001% a 5% em certas sementes¹³.

2.1.1. Características Estruturais

Os alcalóides pirrolizidínicos são compostos orgânicos que incluem o heterocíclico azotado pirrolizidina, hidroximetilada no carbono 1 e hidroxilada no carbono 7¹³. Estas bases azotadas, genericamente designadas por necinas, são esterificadas por ácidos orgânicos, em geral de cadeia ramificada (ácidos néricos)^{1,7,13,18,20}. Até à data, são conhecidas mais de 600 estruturas de alcalóides pirrolizidínicos¹³, diversidade que decorre do número de combinações possíveis entre as várias necinas e uma gama ainda mais diversificada de ácidos néricos, bem como do tipo de esterificação, mono- ou di-esterificadas, em configurações cíclicas ou acíclicas^{1,7,13}.

Coocorrem, principalmente, sob a forma de bases terciárias – solúveis em metanol e em solventes apolares, como o diclorometano – ou sob a forma de N-óxidos – iões quaternários, solúveis em água, metanol ou acetonitrilo¹³, que é normalmente a forma dominante no tecido vegetal¹³.

Os aminoalcoóis, ou necinas, são derivados da pirrolizidina. Este núcleo pirrolizidina é constituído por dois anéis de cinco carbono, saturados, com um átomo de azoto entre eles e muitos alcalóides pirrolizidínicos apresentam uma dupla ligação entre o carbono 1 e 2^{1,7,16,20}. Apenas os alcalóides pirrolizidínicos 1,2- insaturados são considerados tóxicos¹⁶, contrariamente aos alcalóides pirrolizidínicos saturados⁷. Para além do característico núcleo pirrolizidina, a maioria das necinas são hidroxiladas em C1^{1,7}. Uma segunda hidroxilação em C7 pode ocorrer – esta é a modificação mais frequente em necinas saturadas – e, ocasionalmente, as necinas apresentam também hidroxilação em C2 ou C6^{1,7}, o que resulta na formação de estereoisómeros²⁰. A esterificação pode ocorrer em C7 e/ou C9¹ e de acordo com o tipo de esterificação, os alcalóides pirrolizidínicos podem apresentar-se como monoésteres, diésteres ou diésteres macrocíclicos²¹ (Figura 1).

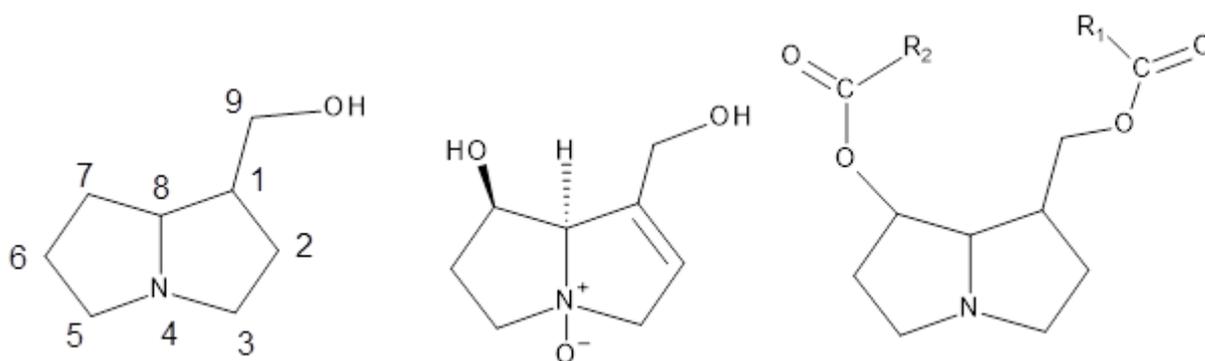


Figura 1. Estruturas fundamentais dos alcalóides pirrolizidínicos. A- hHdroximetilpirrolizidina (necina); B- Necina, 1,2-insaturada e 7-hidroxilada na forma N-óxido (retronecina); C- Diésteres derivados de necinas e ácidos néicos.

Com base na estrutura da necina, os APs classificam-se nos tipos retronecina, heliotridina, otonecina ou platinecina, sendo que nos APs do último tipo, ao contrário dos restantes, a necina é saturada^{1,21}. A otonecina é, do ponto de vista estrutural, a mais distinta ao apresentar um anel monocíclico, diferenciando-se das restantes que apresentam anéis bicíclicos e ainda é oxidada em C8⁷. A retronecina e a heliotridina são diastereoisómeros em C7¹.

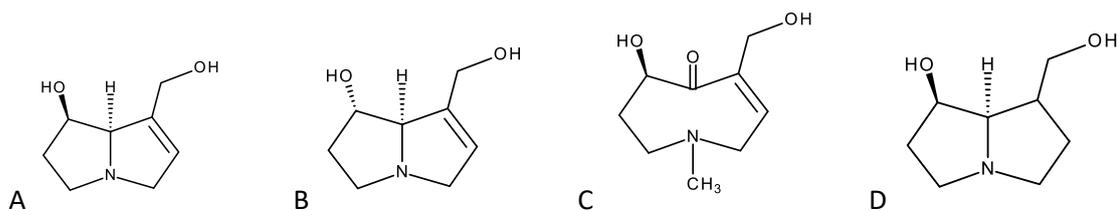


Figura 2. Tipos de necinas que classificam os alcalóides pirrolizídnicos: A- Retronecina B- Helionecina, C- Otonecina, D- Platinecina.

Contrariamente às necinas que exibem um núcleo estrutural comum, os ácidos nécicos são, estruturalmente, muito diversos⁷. Também o tipo de combinação das necinas com os ácidos nécicos de que resultam mono-ésteres,, diésteres acíclicos ou diésteres cíclicos contribui para a diversidade dos APs¹. Na Figura 3 apresentam-se, a título de exemplo, diferentes tipos de APs.

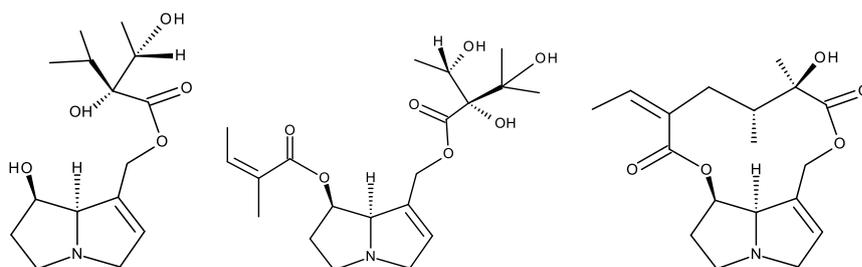


Figura 3. Intermedina: monoéster da retronecina com o ácido traquelântico (característico das Boraginaceas), B- Equimidina: diéster acíclico da retronecina com o ácido traquelântico e o ácido angélico. C- Senecionina: diéster macrocíclico característico da família Asteraceae.

Os ácidos nécicos dicarboxílicos macrocíclicos têm particular interesse por serem os de maior toxicidade potencial⁷.

As necinas podem ainda ser esterificadas com ácidos com sistemas aromáticos¹, algo raro mas que distingue os APs característicos da família *Orchidaceae*⁷.

Para além da classificação mencionada, baseada nas estruturas das necinas, os APs são frequentemente classificados em cinco tipos diferentes (senecionina, triangularina, licopsamina, monocrotalina e falaenopsina), atendendo à combinação de necinas e ácido(s) nécico(s)⁷ e à origem taxonómica²².

O maior grupo é o grupo dos alcalóides do tipo senecionina, encontrados, principalmente, em espécies da família *Asteraceae*, em especial do género *Senecio*^{7,13,18,22} ou do

género *Crotalaria*, da família *Fabaceae*⁷. Este grupo é constituído, maioritariamente, por diésteres macrocíclicos¹³. A necina é, na maioria dos casos do tipo retronecina, podendo também ser do tipo platinecina ou otonecina^{7,13} esterificadas nos grupos hidroxilo em C7 e C9⁷. Os ácidos néricos deste tipo APs são tipicamente dicarboxílicos, ramificados e com 10 átomos de carbono, derivados de duas moléculas de *L*-isoleucina⁷ e de cuja esterificação resultam anéis macrocíclicos de 12 átomos (com exceção de um pequeno grupo de alcalóides que forma anéis com 13)⁷.

Os APs do tipo triangularina constituem o segundo grupo e estão presentes em algumas espécies de *Senecio* e da família *Boraginaceae*⁷. São mono ou diésteres de cadeia aberta de ácidos néricos pentacarbonados⁷.

O terceiro tipo de APs são do tipo licopsamina, principalmente encontrados na família *Boraginaceae*, no género *Eupatorium*, da família *Asteraceae*^{7,13,22} e em espécies da família *Apocynaceae*¹³. São mono ou diésteres de cadeia aberta¹³ e alguns destes alcalóides têm características comuns aos dois grupos anteriores⁷. A necina pode ser do tipo retronecina como do tipo heliotridina¹³.

Os alcalóides do tipo monocrotalina representam o quarto grupo e são predominantemente encontrados na família *Fabaceae*^{7,13,22}, em espécies do género *Crotalaria*¹³. São APs macrocíclicos, semelhantes aos APs do tipo senecionina, esterificados em C7 e C9 com ácidos néricos dicarboxílicos mas definindo um anel macrocíclico com 11 átomos⁷.

O quinto grupo é constituído pelos alcalóides do tipo falanopsina e ipangulina, caracterizados ésteres de ácidos aromáticos a esterificar uma necina, normalmente saturada. São típicos da família *Orchidaceae*^{7,22}. A parte acídica deste tipo de APs apresenta uma elevada diversidade estrutural e pode incluir ácidos aromáticos simples, como o ácido benzóico, ou mais complexos, como o ácido nervogénico⁷.

É importante referir que, para além dos cinco tipos de alcalóides pirrolizidínicos referidos, existem ainda outros que são ésteres de ácidos de cadeia muito curta cujas características não permitem agrupá-los em nenhum dos tipos anteriores⁷.

2.1.2. Biossíntese

Os mecanismos de biossíntese dos APs têm vindo a ser elucidados nas últimas décadas^{1,7,23}. Esta síntese ocorre nas raízes^{1,13,20}, na forma de N-óxidos de alcalóides pirrolizidínicos (PANO)^{1,7,20}. Estas formas quaternárias, por serem extremamente solúveis em água, são facilmente transportadas para as partes aéreas das plantas armazenadas¹ nos vacúolos²⁰. PANO podem depois ser reduzidos, dando origem à base terciária⁷.

A teoria mais unânime sobre as primeiras etapas da biossíntese dos APs defende que a formação do núcleo pirrolizidina se inicia com a condensação de duas moléculas de putrescina, resultante da conversão da arginina e da ornitina²², numa catálise, NAD⁺ dependente¹⁰, pela homospermidina sintase (HSS)^{1,7,10,23}. De facto, é nesta primeira etapa biossintética que as opiniões científicas se dividem, pois alguns autores defendem que esta síntese tem como substrato uma molécula de putrescina e outra de espermidina¹. Em todo o caso, ambas as teorias podem estar corretas, tal como é sugerido por um estudo em que a síntese bacteriana de homospermidina aceita como substratos, tanto putrescina como a espermidina como substrato¹. A HSS (enzima que parece ser exclusiva das espécies produtoras de alcalóides pirrolizidínicos^{7,10}) catalisa a transferência do resíduo 1,3-diaminopropano da putrescina ou espermidina para a segunda molécula de putrescina^{7,10,22}, com formação do intermediário simétrico denominado homospermidina^{1,7}.

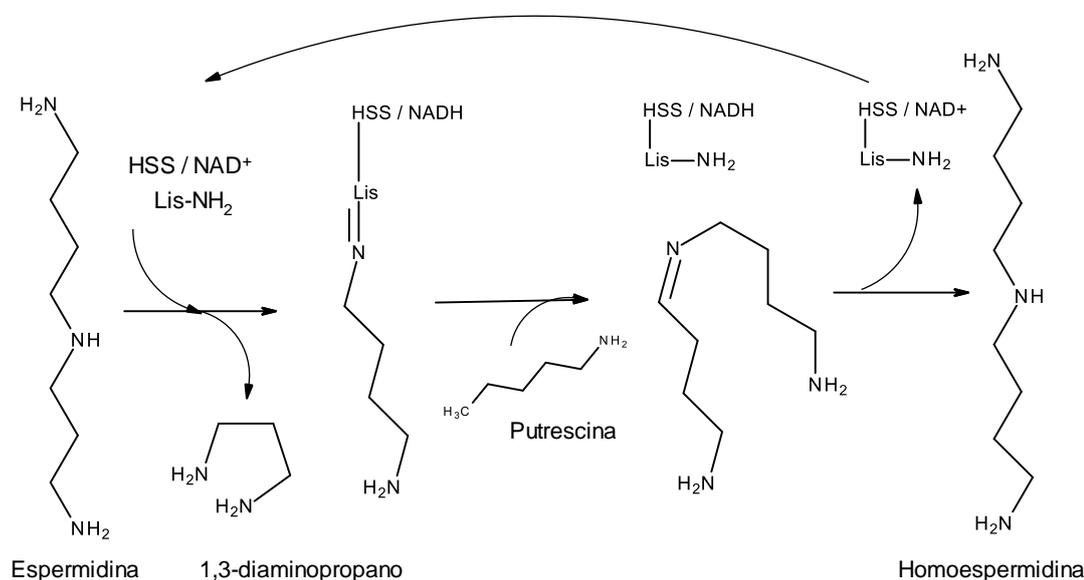


Figura 4. Mecanismo de síntese da homospermidina. O grupo amina de um resíduo de lisina (Lis) reage com a molécula de espermidina (ou de putrescina), libertando 1,3-diaminopropano com redução de NAD⁺ a NADH, cofactor da HSS. Em seguida, o resíduo é transferido para a molécula de putrescina, regenerando a lisina e formando um intermediário, que é reduzido pela HSS ligada a NADH para libertar a homospermidina e reciclar o complexo HSS/NAD⁺ ⁷.

A homospermidina é oxidada a 4,4'-imunodibutanal, segundo se pensa por catálise de diaminas oxidases dependentes de cobre e sofre ciclização originando pirrolizidina-I-carbaldeído, seguida de redução, dando origem a I-hidroximetilpirrolizidina^{1,7}. Não há certezas relativamente às enzimas responsáveis, mas sabe-se que a I-hidroximetilpirrolizidina é precursora da retronecina⁷.

Contrariamente às necinas que são sintetizadas através de uma via comum, os ácidos nécicos, maioritariamente derivados de *L*-valina, *L*-leucina, *L*-isoleucina e *L*-treonina^{1,18}, dependem de diferentes mecanismos biossintéticos⁷. A síntese de ácidos monocarboxílicos como o ácido angélico ou o ácido tíglico (pentacarbonados) ocorre por degradação da treonina¹ a ácido 2-oxobutanóico que, da interação com piruvato, origina isoleucina¹. Por sua vez, a isoleucina sofre uma série de reações das quais vai resultar a formação de tiglil-CoA e este pode ser isomerizado a angelil-CoA⁷. Finalmente, os resíduos dos ácidos tíglico e angélico podem ser transferidos para as necinas e, conseqüentemente, a coenzima A é libertada⁷. No caso da síntese de ácidos dicarboxílicos, como o ácido senecióico, o viridiflórico e traquelântico é a valina que reage com acetaldeído ativado¹.

2.2. TOXICINÉTICA

Os APs estão entre as mais potentes toxinas naturais. A toxicidade destes compostos está documentada e é a principal característica associada à atividade biológica, quase a única¹.

Após ingestão, a absorção ocorre no trato gastrointestinal^{1,13} e a sua lipofilicidade facilita a distribuição por vários compartimentos, incluindo a placenta¹. A eliminação ocorre, maioritariamente (cerca de 80%) através da urina, das fezes e do leite, depois de várias etapas de metabolização e/ou conjugação que originam metabolitos hidrossolúveis¹.

Se por um lado a metabolização favorece a *clearance*, por outro, é a origem dos metabolitos ativos responsáveis pela toxicidade. O fígado é o órgão onde há maior acumulação de alcalóides e onde ocorre, maioritariamente, a referida ativação dos APs^{1,13,20}.

São três as principais vias de metabolização de APs: a hidrólise mediada por esterases, que resulta na produção de necinas e ácidos nécicos através da quebra das ligações éster em C7 e C9; a N-oxidação (exclusiva dos APs do tipo retronecina e heliotridina), que, como o nome indica, leva à formação de N-óxidos de alcalóides pirrolizidínicos; e a oxidação (exceto APs do tipo otonecina, N-metilados) origina ésteres pirrólicos, pirróis ou alcalóides dihidropirrolizidínicos (DHPA)^{1,7,13,24}.

A hidrólise pode ocorrer no intestino ou durante todo o ciclo de distribuição²⁰, juntamente com a N-oxidação, que permite a formação de PANOs, solúveis em água e por isso mais facilmente excretados, constituem as duas vias importantes de *clearance*^{1,13,22,25}. As enzimas responsáveis pela oxidação dos alcalóides pirrolizidínicos a DHPA são monooxigenases do citocromo P450 (CYP450), sobretudo as isoformas CYP3A e CYP2B^{1,13,25}. Estas enzimas explicam, em parte, as diferenças de suscetibilidade entre espécies a estes compostos¹.

A formação de DHPA ocorre através da hidroxilação da necina em C3 ou C8, no caso específico dos alcalóides pirrolizidínicos do tipo retronecina e heliotridina^{1,7,13}. Já no caso dos APs do tipo otonecina, é necessária a N-desmetilação^{1,7,13}, seguida do fecho do anel⁷. Estes metabolitos reativos são capazes de se ligar a macromoléculas como o glutatião (GSH) e de formar conjugados mais hidrossolúveis, de grande relevância para *clearance*^{1,7,25}. Contudo, se os níveis de intermediários reativos forem muito elevados, provocando depleção de GSH, o que vai causar lesões hepáticas graves⁷. Da mesma maneira que se ligam a moléculas como o glutatião, os ésteres pirrólicos, instáveis e altamente reativos²², podem também ligar-se a nucleófilos com enxofre, azoto ou oxigênio, nomeadamente, proteínas e a ácidos nucleicos, levando à formação de adutos¹ e dar início a aberrações cromossômicas, genotoxicidade e carcinogénese^{1,20,26}. Depois do fígado, os pulmões, são o segundo maior alvo da toxicidade¹.

Os pirróis podem ainda sofrer hidrólise originando dehidronecinas (DHP), que são, também, metabolitos tóxicos, mas menos reativos que os ésteres pirrólicos anteriormente mencionados^{1,7,13}.

Como referido, uma das vias catabólicas é a N-oxidação catalisada por monooxigenases que contêm flavina (FMOs), resultando na formação de N-óxidos de alcalóides pirrolizidínicos^{7,13}. Os APs N-metilados do tipo otonecina não são suscetíveis a esta oxidação⁷. Os N-óxidos formados ficam disponíveis para a conjugação e consequente excreção²⁵, contudo, podem também ser reconvertidos nas formas não oxidadas, renovando o seu potencial de toxicidade e reiniciando os mecanismos de *clearance*^{1,7,13}. O balanço entre a formação de DHPA e a formação de compostos de desintoxicação, como as necinas, ácidos nécicos e N-óxidos de alcalóides pirrolizidínicos é outro fator que desempenha um papel relevante na explicação das diferenças de suscetibilidade entre espécies^{1,7} (Figura 5).

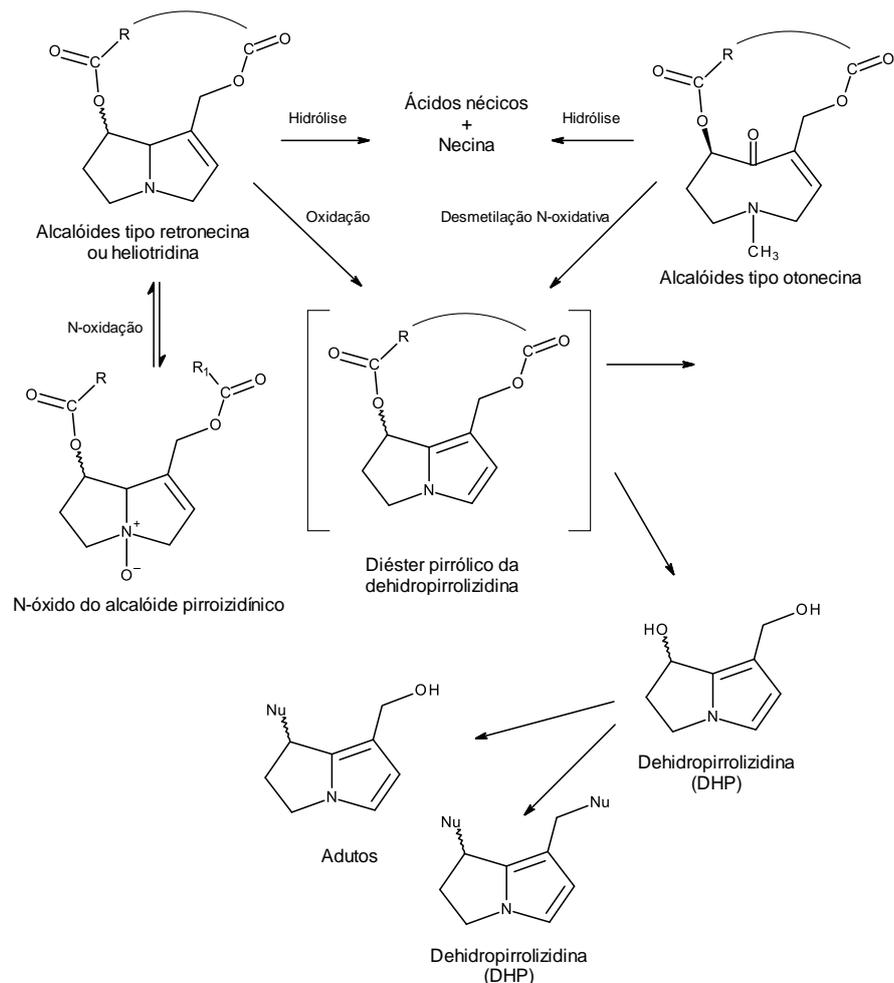


Figura 5. Metabolismo dos alcalóides pirrolizidínicos 1,2-insaturados.

Os APs que apresentam necinas saturadas, como APs do tipo platinecina, não são considerados tóxicos^{7,20}. Contrariamente aos APs 1,2-insaturados e o metabolismo oxidativo dos APs do tipo platinecina resulta em compostos polares não reativos que são facilmente excretados devido à sua solubilidade em água^{7,8}.

2.3. ASPETOS TOXICOLÓGICOS

2.3.1. Intoxicações Agudas e Crônicas

Uma vez que é no fígado que ocorre, maioritariamente, a bioativação de APs, este é o principal alvo da toxicidade destes compostos^{1,13} e as lesões causadas nos hepatócitos e nas paredes das veias hepáticas levam ao desenvolvimento de Doença Veno-oclusiva Hepática (HVOD)¹³, atualmente denominada Síndrome de Obstrução Sinusoidal (HSOS)¹ e é a manifestação clínica mais frequente¹³, sendo mesmo considerada um marcador/indicador de

intoxicação por APs¹. Os sintomas incluem vômitos, aumento do fígado e diarreia hemorrágica¹.

Há evidências que sugerem que uma única exposição a APs pode desencadear o desenvolvimento de patologias hepáticas crônicas sem a intervenção de qualquer outro fator²⁰, sendo, por isso, recomendável que a exposição a estas toxinas seja a menor possível¹³. Dado que o potencial toxicológico de cada alcalóide e as relações entre doses e efeitos continuam por esclarecer²⁰ e que as informações sobre as consequências, a curto e a longo prazo, das intoxicações, são escassas, é impossível determinar a incidência e avaliar se a exposição a estas toxinas resulta, ou não, num aumento de doenças crônicas hepáticas no Homem²⁰. Os adutos formados já demonstraram possuir estabilidade suficiente para serem usados como biomarcadores de HSOS induzida por APs assim como de tumores hepáticos¹. O facto de adutos pirrol-proteínas já terem sido detetados no sangue de pacientes com doenças hepáticas consolidou a hipótese de que podem ser usados para monitorizar ou diagnosticar doenças hepáticas crônicas¹.

2.3.2. Genotoxicidade e Carcinogenicidade

O desenvolvimento de tumores no Homem enquanto consequência direta do consumo de APs ainda não foi demonstrado¹. No entanto, já foi demonstrado que o metabolismo da riddellina no Homem é semelhante ao metabolismo nos roedores¹ e envolve a formação de adutos de DNA, já explicada^{1,13}. Verificou-se que os níveis de adutos de DNA induzidos por pirróis estavam associados ao aparecimento de tumores e podiam por isso ser usados como biomarcadores de carcinogenicidade causada por APs¹. Uma vez que este alcalóide induz o desenvolvimento de tumores em roedores, a possibilidade de desencadear o mesmo efeito no Homem não pode ser descartada¹. Outros APs 1,2-insaturados já revelaram o mesmo potencial tendo sido observada carcinogenicidade após exposição oral crónica a vários alcalóides deste grupo¹³.

Após análises realizadas a diversos produtos, em que espécies vegetais que contêm APs faziam parte da sua constituição, a Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Cancro (IARC – *International Agency for Research on Cancer*), reuniu evidência suficiente para classificar três APs – lasiocarpina, monocrotalina e riddelliina – como possíveis carcinogénicos para o Homem – Grupo 2B^{13,15,25}. Outros APs avaliados não foram classificados (Grupo 3) devido a limitações relativas à informação disponível¹⁹.

Segundo o Programa Internacional de Segurança Química (PISQ) o não acompanhamento contínuo e a longo prazo das populações expostas a APs torna impossível

avaliar o potencial carcinogénico de forma exata. No entanto, os efeitos carcinogénicos demonstrados em espécies animais cujo metabolismo destas toxinas é idêntico ao do Homem obriga a que o potencial carcinogénico também no Homem seja seriamente considerado ^{13,25}.

2.3.3. Outros Tipos de Toxicidade

Os pirróis podem atingir as arteríolas pulmonares produzindo danos semelhantes a HSOS, fazendo dos pulmões outro alvo de lesões¹. Após alcançarem os pulmões, ocorre a formação de trombos e o espessamento das paredes dos vasos sanguíneos leva à sua oclusão e inflamação¹. A combinação destes fenómenos desencadeia, por fim, hipertensão pulmonar e falência hepática¹.

Casos de neurotoxicidade e teratogenicidade também já foram associados a estas substâncias, sendo este último caso justificado pelo facto de alguns alcalóides pirrolizidínicos conseguirem atravessar a placenta^{1,20}.

2.3.4. Fatores Influenciadores do Perfil Toxicológico

A base estrutural para os efeitos toxicológicos dos APs já foi descrita em alguns trabalhos¹. Mas diferenças toxicológicas entre APs dentro da mesma espécie e relativamente aos mesmos alcalóides pirrolizidínicos entre espécies diferentes existem e não podem ser ignoradas^{1,27}.

A presença da dupla ligação entre C1 e C2, encontrada nos APs do tipo retronecina, heliotridina e otonecina tem sido associada à toxicidade destes compostos^{1,8,20}, assim como a presença de um ou dois grupos hidroxilo ligados ao anel pirrol¹. Outros estudos sugeriram que a presença de um grupo metilo em C1 é relevante, assim como a presença de dois grupos esterificados e uma ramificação em pelo menos num dos ácidos carboxílicos^{1,22}. Por esta razão, os APs que apresentam maior toxicidade são os diésteres cíclicos e os monoésteres são caracterizados pelo nível mais baixo de lesões^{1,20,25}.

No entanto, não são só as características estruturais que afetam o perfil toxicológico dos APs. O facto de as diferentes vias metabólicas tanto poderem levar à *clearance* como à bioativação, vai, inevitavelmente, influenciar a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos^{13,20}. O balanço entre estes dois processos vai ser determinado pela atividade e expressão enzimática que difere entre, por exemplo, espécies e géneros, e consequentemente vai influenciar a maior ou menor suscetibilidade de alguns animais à toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos^{13,20}. No

entanto, o conhecimento relativo à expressão de enzimas é muito limitado para permitir que se estabeleça uma relação causal entre o metabolismo e a sensibilidade à toxina¹³.

Determinados metais e bactérias podem agravar intoxicações por APs¹. A exposição simultânea a monocrotalina, em quantidades que normalmente não causariam danos, e a um dos principais componentes da membrana externa de bactérias gram-negativas, denominado LPS, revelou potencial desencadear efeitos hepatotóxicos¹ e ao ser estudado o impacto de uma dieta rica em cobre na toxicidade de APs descobriu-se que a exposição a retrorsina e cobre leva a danos hepáticos mais graves do que a exposição apenas a retrorsina¹.

A toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos pode ainda ser influenciada pela idade e pelo género, uma vez que existem evidências de que indivíduos do sexo masculino constituem um grupo de risco^{1,26}, assim como bebés e fetos, que são o grupo mais vulnerável¹ e uma das explicações para esta vulnerabilidade pode ser o facto de que neste último grupo os níveis de cobre no fígado são elevados naturalmente²⁰.

Torna-se urgente a existência de informação relativa ao perfil toxicológico individual destes compostos. Os alcalóides pirrolizidínicos que ocorrem como contaminantes apresentam uma variedade estrutural considerável, no entanto, a avaliação toxicológica baseia-se quase exclusivamente na informação de alcalóides pirrolizidínicos como a lasiocarpina ou riddelliina, considerados os mais tóxicos^{25,28,29}. Esta abordagem pode resultar num exagero na classificação do risco e, conseqüentemente, na implementação de medidas em marketing e produção de alimentos e produtos medicinais²⁵. Existem projetos de investigação cujo objetivo é verificar a hipótese de diferentes alcalóides pirrolizidínicos poderem apresentar potências toxicológicas significativamente distintas. Testes *in vitro*, recorrendo a alcalóides pirrolizidínicos selecionados, representativos de diferentes classes estruturais, já foram iniciados de modo a ser possível estabelecer Fatores de Potência Relativa^{5,25,28}.

3. A PROBLEMÁTICA DA CONTAMINAÇÃO

Intoxicações pontuais, mas catastróficas, são conhecidas, estão bem documentadas^{20,30} e não são um fenómeno novo⁴. São vários os casos reportados de intoxicações graves em países em desenvolvimento por consumo de cereais contaminados^{7,25}. O relato de contaminações com APs estava, inicialmente, associado a estes países, estavam geralmente relacionadas com cereais e legumes ou com produtos vegetais usados nas medicinas tradicionais. No entanto, nas décadas de 70 e 80, estudos de países como o Reino Unido e Estados Unidos da América, reportaram casos de cirrose provocada pelo uso de produtos medicinais que continham alcalóides pirrolizidínicos, provando que estas situações podem ocorrer mesmo em países com serviços de saúde desenvolvidos²⁰. Apesar de intoxicações agudas por APs serem pouco frequentes na Europa, as preocupações relativas à exposição prolongada a estes contaminantes, mesmo que em quantidades residuais, através da alimentação ou produtos medicinais à base de plantas, são cada vez mais justificadas²⁰. Assim, a toxicidade crónica é agora, também, uma realidade¹ e os avanços no conhecimento sobre os riscos e os teores de APs nestas matérias revelaram que a situação é séria e tem uma escala sem precedentes⁴.

Em 1988, A Organização Mundial de Saúde (OMS) aconselhou a limitação da exposição a alcalóides pirrolizidínicos insaturados²⁰. Nos anos 90, foram estipulados limites para o teor em APs em produtos medicinais à base de plantas⁵. Os suplementos alimentares cuja constituição apresentasse plantas produtoras de alcalóides pirrolizidínicos foram banidos do mercado dos Estados Unidos da América, em 2001, após reconhecimento pela *Food and Drug Administration* da falta de dados para garantia da segurança do consumo destes produtos²⁰. Em 2013, o Instituto Federal de Avaliação dos Riscos (BfR – *Bundesinstitut fuer Risikobewertung*) publicou resultados de análises a 221 amostras de plantas para tisanas medicinais, que revelando a presença de alcalóides pirrolizidínicos, o que despoletou a discussão sobre uma potencial contaminação de matéria vegetal usada na produção de medicamentos⁵.

Uma das descobertas mais surpreendentes dos últimos anos nesta matéria relaciona-se com a ocorrência de um teor elevado em alcalóides pirrolizidínicos em alimentos vegetais e em plantas para tisanas e outras preparações que, naturalmente, não têm capacidade para produzir APs^{7,25,31}. Inicialmente este fenómeno era apenas justificado pela colheita acidental simultânea de plantas infestantes produtoras de alcalóides pirrolizidínicos, no entanto, foi recentemente evidenciada a transferência horizontal dessas toxinas, o que contribui, pelo menos em parte, para a contaminação^{25,31,32}. Transferências diretas entre folhas ou raízes já foram excluídas. Embora o processo exato de translocação permaneça desconhecido, este

tipo de transferência envolve um *uptake* do solo, por difusão, sem necessidade de qualquer transportador³¹, o que implica que a contaminação possa ocorrer através de matéria vegetal decomposta no solo^{31,32}. Estas descobertas levantam algumas preocupações, principalmente ao saber-se que, por exemplo, a presença de uma única planta *Senecio* por hectare de plantação de Erva-de-São-João (*Hypericum perforatum*) é suficiente para que o teor de alcalóides pirrolizidínicos na cultura exceda os limites recomendados pela Agência Europeia do Medicamento (EMA – *European Medicines Agency*)⁴. Para garantir uma produção livre de alcalóides pirrolizidínicos, todas as plantas infestantes têm de ser completamente removidas dos solos^{25,31}.

Os estudos realizados nos últimos anos reforçam a ideia de que a presença de APs na cadeia alimentar é mais complexa do que inicialmente previsto e patologias crónicas associadas a esta toxina facilmente passam despercebidas, tendo já recebido a denominação de “Doença Iceberg”^{20,33}. Como já referido, e o controlo do teor destas toxinas é dificultado pela dispersão das espécies e pelos fatores dos quais depende a produção, tais como a estação do ano⁵. Dado o desafio e a necessidade de um esforço coletivo para reduzir a contaminação por alcalóides pirrolizidínicos, algumas entidades, tais como a Agência Europeia do Medicamento, reconhecem que boas práticas agrícolas e de colheita (GACP – *Good Agricultural and Collection Practice*³⁴) precisam de ser refinadas e redirecionadas tendo em conta esta problemática⁴.

3.1. CONSUMO HUMANO E ANIMAL

Desde os resultados das análises de 2013 a produtos medicinais que a indústria farmacêutica direcionou parte do seu foco para a implementação de medidas que visam evitar ou reduzir, tanto quanto possível, a exposição a APs através destes produtos⁵. Embora plantas produtoras e/ou que contenham APs possam ser usadas como plantas medicinais ou na produção de medicamentos, a exposição por estes produtos é, por norma, mínima⁷.

Contudo, a ocorrência de APs na cadeia alimentar, no mel, em suplementos alimentares, especiarias, etc., as principais fontes de exposição do Homem a estas toxinas^{1,14,35} tem grande relevância, não obstante a escassez de dados cientificamente validados³⁵. A contaminação de ovos e carne por parte destes metabolitos parece ser rara; no leite são, por vezes, encontradas concentrações muito baixas, uma vez que as diluições no processamento deste produto as reduzem relativamente ao leite inteiro e não processado¹.

A Agência Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA – *European Food Safety Authority*) já destacou a necessidade de reunir mais informação relativa à contaminação de

produtos de origem animal, uma vez que a quantidade ingerida por quilograma de peso corporal pode expor o consumidor a quantidades de alcalóides significativas, representando um problema de segurança alimentar sério^{20,25}.

3.1.1. Fontes de Contaminação

Um dos bens alimentares em destaque no que toca a esta problemática é o mel. Estima-se que seja uma das principais fontes de exposição^{1,20,25,35} e tem recebido atenção crescente nos últimos anos¹³. São várias as origens botânicas e geográficas dos APs encontrados¹ e este “background” geográfico é relevante¹³, dado que consoante a matéria vegetal, o tipo e teor destas toxinas varia¹.

Consideradas as concentrações já encontradas em algumas amostras de mel, uma dose equivalente a uma ou duas colheres de sopa por dia (equivalente a 10 - 20 g) pode facilmente exceder o limite recomendado: máximo de 1,0 µg de alcalóides pirrolizidínicos por dia^{1,20}. O pólen, a fonte original da contaminação, transfere para o mel os APs, uma possível filtração (para a remoção do pólen, com o objetivo de minimizar a contaminação) é inútil^{1,13}.

Produtos à base de plantas para preparação de tisanas, disponíveis em superfícies comerciais revelaram também um teor surpreendentemente elevado em alcalóides pirrolizidínicos, incluindo o chá verde e chá preto^{1,20}. Nos últimos anos foi reportado que chás e tisanas à base de plantas não produtoras de alcalóides pirrolizidínicos, tais como *M.chamomilla* ou *Mentha x piperita* L., podem apresentar quantidades elevadas destes metabolitos como consequência de contaminação cruzada¹. Os APs mais frequentes são do tipo senecionina¹, sendo os PANOs predominantes, relativamente às bases terciárias correspondentes¹.

Excluindo espécies associadas a tisanas e medicamentos à base de plantas, as espécies mais associadas a intoxicações pertencem aos géneros *Heliotropium* e *Crotalaria*, que ocorrem como infestantes (ervas daninhas) em culturas de cereais ou legumes. Esta situação é particularmente agravada pelas cheias e outras condições que favoreçam o crescimento das infestantes. Os géneros referidos anteriormente são também reportados em casos de intoxicações em animais, juntamente com espécies dos géneros *Trichodesma* e *Senecio*¹⁷. Parte do tratamento dos grãos envolve a seleção e remoção de sementes estranhas antes da moagem ou de qualquer outro procedimento posterior à colheita. Este tratamento nem sempre é possível ou eficaz, em especial, em países em desenvolvimento, o que pode explicar a diferença no número de casos de intoxicação aguda registados nesses países e em países ditos desenvolvidos²⁰.

Algumas espécies de *Borago* e *Symphytum* estão associadas a contaminação de saladas e folhas de *Senecio vulgaris* coocorrem, acidentalmente, em saladas comerciais pré-embaladas¹², especialmente naquelas onde há semelhanças morfológicas com as espécies alimentares; algumas especiarias usadas na produção de molhos e condimentos alimentares foram reportadas como fonte de APs²⁰.

As análises realizadas a três tipos de suplementos à base de plantas não associadas à produção de APs (*Valeriana officinalis* L., *Hypericum perforatum* L.), suplementos à base de plantas produtoras de alcalóides pirrolizidínicos (*B. officinalis*, *Eupatorium perfoliatum* L., *Eupatorium perfoliatum* L., *Pulmonaria officinalis* L.) e suplementos contendo pólen, propólis e geleia real, revelaram distintos níveis de contaminação¹. Suplementos derivados de plantas produtoras de alcaloides pirrolizidínicos são os que apresentam maior quantidade de alcalóides pirrolizidínicos, sendo os do tipo licopsamina (licopsamina, intermidina, equimidina) os mais comuns¹. No entanto, os restantes grupos revelaram também a presença destes compostos, provavelmente devido a contaminação cruzada¹.

3.1.2. Rações

O registo da ingestão animal de alcalóides pirrolizidínicos na União Europeia (UE) apenas fornece estimativas gerais da quantidade e tipo de rações consumidas por diferentes tipos de gado e deve-se ter em conta que as rações usadas na EU apresentam variações significativas¹³.

Por norma, animais de pasto evitam este tipo de plantas, no entanto, em situações extremas, como cheias e secas, estes podem não ter outra opção^{13,17} uma vez que o alimento é escasso¹⁷. Problemas também podem surgir através da alimentação sob a forma seca, como feno e silagem, uma vez que nesta forma os animais já não conseguem distinguir as plantas produtoras de alcalóides pirrolizidínicos das plantas de que se alimentam, porque o cheiro e paladar são menos notórios¹³. As toxinas resistem aos processos de armazenamento e o facto de se encontrarem totalmente misturadas com o restante alimento, faz com que estes fenómenos de contaminação estejam associados a uma elevada taxa de mortalidade¹⁷.

Uma das recomendações da ESFA é a monitorização do teor em alcalóides pirrolizidínicos em rações, dada a possibilidade (ainda não confirmada) de ocorrência de exposição humana a estas toxinas através da alimentação de produtos animais²⁰.

3.2. CONTEXTO REGULAMENTAR

3.2.1. Limites

Mesmo não sendo um fenômeno recente, após a publicação do BfR em 2013, tornou-se evidente que a contaminação com alcalóides pirrolizidínicos representa um problema de saúde sério e um grande desafio para a agricultura e horticultura em geral^{4,5}.

Num comunicado público, em 2014, o Comité de Produtos Medicinais à Base de Plantas (HMPC – *Herbal Medicinal Products Committee*) da EMA recomendou uma exposição a APs através de HMPs limitada a 0,35 µg/dia, valor recomendado para um peso corporal de 50 Kg²⁰, limite originalmente obtido pela EFSA²⁰.

Em maio de 2016, este limite é atualizado. A EMA passa a recomendar um limite transicional de exposição a APs a partir HMPs de 1,0 µg por dia (limite referente aos produtos finais), durante três anos, uma vez que este problema de contaminação não apresentaria resolução imediata⁵. Após este período, o valor seria então reduzido a 0,35 µg/dia, como recomendado inicialmente. Durante os três anos de limite transicional, os produtores deveriam tomar as ações necessárias à redução da contaminação ao limite inferior e entre as medidas esteve o estabelecimento de um código de práticas⁵. A recomendação relativa aos limites de exposição foi implementada por autoridades nacionais a nível europeu, mas não de forma uniforme, isto é, o limite de 1,0 µg por dia não foi aceite em todos os países⁵.

Em junho de 2017, o Painel CONTAM (Painel Científico dos Contaminantes da Cadeia Alimentar) da EFSA publica uma nova avaliação sobre o potencial carcinogénico dos APs, incluindo novos dados relativos à sua ocorrência no mel, em tisanas e suplementos alimentares^{4,5,16} e é aconselhado um *intake* diário de APs inferior a 0,007 µg / Kg peso corporal¹⁶, valor que, considerando o peso corporal de 50 Kg usado como referência em 2014, corresponde ao limite de exposição diária a APs de 0,35 µg.

Atualmente, os fabricantes são capazes de manter a exposição diária a APs de 1,0 µg para a maioria dos HMPs, mas a redução para valores como 0,35 µg APs/dia não é, neste momento, realista. Assim, o período transitório de três anos de exposição diária aos alcalóides pirrolizidínicos de 1,0 µg/dia, foi prolongado por mais dois anos, até maio de 2021, mas todos os esforços devem ser feitos para que sejam implementadas ações que assegurem que a exposição diária a estas toxinas através de HMPs não ultrapassa o 1,0 µg^{4,5}.

3.2.2. Estratégias de Gestão de Risco

A origem natural de matérias-primas vegetais e o caráter complexo das mesmas exigem requisitos específicos para avaliação de qualidade de alimentos e medicamentos à base de plantas, desde a sua produção²⁸.

As preocupações relativas à qualidade de HMPs obrigam os Estados Membros a ter em consideração dois aspetos principais: implementação de testes adequados para assegurar que os níveis de alcalóides pirrolizidínicos são controlados e estão de acordo com os limites estipulados e a implementação de medidas para evitar ou reduzir a contaminação em HMPs^{4,34}. Em conjunto com produtores de HMPs, foi desenvolvido o Código de Práticas (CoP – *Code of Practice*) pela Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO – *Food and Agriculture Organization*) e Organização Mundial de Saúde (OMS)⁴. O principal objetivo deste código é a identificação de possíveis riscos, para todos os passos de produção, que compreende desde o cultivo, à expedição do produto final⁵. Para cada um destes passos, são propostas práticas de gestão para o controlo de plantas infestantes, consoante o potencial de contaminação, e avaliação dessas práticas^{4,5}. Estas medidas contribuem para uma redução contínua e sustentável de alcalóides pirrolizidínicos, garantindo uma posterior produção de medicamentos mais segura e de qualidade consistente^{5,34}.

A necessidade de implementação de medidas é estabelecida considerando fatores como a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos presentes na planta (quando conhecidos), a contribuição das diferentes plantas que contêm alcalóides pirrolizidínicos para o *intake* específico ou total destes compostos, proximidade das plantas produtoras de alcalóides pirrolizidínicos a culturas ou pastagens, grau de infestação, circunstâncias locais, clima, tipo de solo, entre outros¹⁷. Mais uma vez, a diversidade estrutural e geográfica destes compostos é um obstáculo ao estabelecimento de limites regulamentares e medidas. A estratégia para a gestão dos riscos associados à contaminação de HMPs com alcalóides pirrolizidínicos deve focar-se inicialmente nas substâncias à base de plantas cujo risco de contaminação seja elevado e assegurar a disponibilidade de produtos medicinais à base de plantas com baixo risco de contaminação, reduzindo a exposição através destes produtos para valores tão baixos quanto possíveis (princípio ALARA – *as low as reasonably achievable*)^{4,14}.

Com o objetivo de avaliar a presença de alcalóides pirrolizidínicos em HMPs, em 2016 foram definidas três categorias de classificação do potencial de contaminação:

- A: muito baixa ou sem problema de contaminação (“*very low or no problem of contamination*”);
- B: baixo problema de contaminação (“*low problem of contamination*”);

- C: problema relevante de contaminação (“*relevant problem of contamination*”) ^{4,5}.

Esta classificação vai definir a frequência dos testes (“*skip testing*”, “*intensified skip testing*” or “*routine testing*”) ^{4,5}. A atribuição de cada categoria depende do conhecimento do potencial de contaminação já conhecido. No caso da não existência de dados, devem ser realizados testes de rotina ⁵. As matérias-primas de HMPs que pressupõem a possibilidade dos produtos finais proporcionarem exposições a APs superiores a 1,0 µg/dia devem ser rejeitadas ⁵.

Dadas as particularidades, já descritas, da contaminação por APs, o CoP é direcionado tanto para indústria farmacêutica como para todas as etapas de produção agrícola ⁵. A implementação destas medidas pode ser dificultada em alguns países por falta de conhecimento ou recursos, ou devido a limitações geográficas, ambientais ou práticas ¹⁷ e, assim, a exequibilidade pode estar limitada ⁵. Estes obstáculos justificam a avaliação das medidas por autoridades regulamentares nacionais de modo a assegurar que são adaptadas à realidade do país ¹⁷.

A aplicação das práticas descritas não pode resultar em consequências prejudiciais. Alguns métodos podem apresentar-se destrutivos, tanto para outras plantas (cuja cultura estão a contaminar, por exemplo) como para as espécies em que pretendemos atuar. A aplicação de métodos, que incluem, entre outros, o uso de herbicidas seletivos, limpeza de sementes, inspeção dos campos antes da colheita ⁴, deve ser direcionada à erradicação de plantas individuais e deve ser realizada após um bom planeamento, tendo em conta os possíveis riscos ambientais ¹⁷. Apesar da urgência requerida na implementação destas práticas, os resultados não vão ser imediatos, é necessário tempo até se mostrarem eficazes ⁴.

Além das medidas e ações individuais levadas a cabo pelas entidades responsáveis envolvidas nos diferentes passos do processo de produção, desde o cultivo, à libertação do produto final, projetos de investigação desempenham um papel importante na resolução da problemática dos alcalóides pirrolizidínicos ^{5,28}. Um dos projetos atualmente a decorrer trata-se do estabelecimento de uma base de dados com o conjunto de plantas infestantes presentes em culturas de plantas medicinais, com especial foco nas produtoras de APs, e com informações relativas ao *uptake* destas toxinas ²⁸. A descrição de características de espécies de *Crotalaria*, *Echium*, *Heliotropium*, *Myosotis* e *Senecio* está, também, a ser reunida de modo a poder ser usada em práticas agrícolas ²⁸, uma vez que a deteção precoce de plantas produtoras de APs revela um papel de extrema importância na redução dos níveis de contaminação e na minimização de custos associados ao controlo. Para esta deteção precoce ser possível, é

essencial a sensibilização de agricultores, produtores de gado e mesmo da população local, através de ações de sensibilização direcionadas. A disponibilidade de informação fidedigna poderá ser divulgada através de materiais como panfletos ou *websites*¹⁷.

4. MÉTODOS ANALÍTICOS

A contaminação de matérias vegetais usadas na produção de produtos medicinais à base de plantas (HMPs – *Herbal Medicinal Products*)⁶ revelou os desafios inerentes à precisão e sensibilidade^{5,14,19} que os métodos analíticos necessitam de apresentar para a identificação e quantificação dos alcalóides pirrolizidínicos e correspondentes N-óxidos^{5,12,14,19}. A diversidade estrutural^{8,12} e as variações que estas fitotoxinas apresentam nas matrizes a analisar tornam impossível qualquer generalização e, conseqüentemente, a descrição de todos os métodos possíveis para a análise quantitativa de alcalóides pirrolizidínicos alvo e limites a aplicar^{3,6}.

Só no último trimestre de 2019, o *European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM) abriu, para consulta pública, o texto provisório de um capítulo geral, específico para APs (“2.8.26. *Contaminant pyrrolizidine alkaloids*”), a incluir, pela primeira vez, na Farmacopeia Europeia (32.1)^{3,29}. O âmbito deste capítulo é a análise vestigial de alcalóides pirrolizidínicos alvo em fármacos vegetais e outros produtos medicinais à base de plantas contaminados com outras plantas e não a determinação de alcalóides pirrolizidínicos que ocorrem naturalmente nas plantas^{3,6,36}. Descreve 28 alcalóides pirrolizidínicos alvo (enumerados na referência⁶) e permite o uso de vários procedimentos de cromatografia acoplada a espectrometria de massa bidimensional (MS/MS) ou a espectrometria de massa (MS) de alta resolução que reúna os requisitos de validação especificados no capítulo^{3,6}. O referido capítulo foi adotado pela Farmacopeia Europeia em março de 2020, trazendo à comunidade científica e aos laboratórios de controle de produtos farmacêuticos a primeira orientação oficial sobre os procedimentos para estas análises. Tais procedimentos são suportados no conhecimento prévio dos analitos, das suas propriedades físico-químicas e dos conhecimentos impostos pelas matrizes que genericamente condicionam os processos de preparação de amostra, extração, *clean-up*, identificação e doseamento.

4.1. AMOSTRAGEM E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A natureza do material a analisar determina, desde o primeiro momento, cuidado e rigor. A amostragem é determinante, sobretudo para as análises de lotes de matérias-primas vegetais onde a contaminação pode ser limitada e ocorrer em pontos localizados dentro do

lote, “*spot contamination*”. Para que a amostra para análise seja representativa do lote de material a ser examinado^{6,37}, é importante assegurar a melhor homogeneização da matéria do lote, para o que concorre a dimensão do lote e a uniformidade do tamanho das partículas^{6,37}.

A escolha da técnica de amostragem depende do tipo de material a ser examinado^{6,13} e é responsabilidade do analista, que pode usar qualquer metodologia, desde que validade⁶.

Para o processo extrativo, dada a diversidade estrutural dos APs e coocorrência destes com os N-óxidos correspondentes, deve ser garantida a eficiência para extração simultânea de todos os tipos de alcalóides, em ambas as formas¹³. Na forma de bases terciárias, podem ser extraídos, pelas metodologias aplicáveis aos alcalóides, isto é, em meio alcalino pelos solventes orgânicos semi-polares ou em meio aquoso ácido, pela água¹³. Já as formas oxidadas (N-óxidos) são facilmente extraíveis por solventes polares como o metanol, ou por soluções aquosas ácidas¹³.

A complexidade das matrizes obriga a que a maioria das análises vestigiais de alcalóides pirrolizidínicos necessite de procedimentos de “*clean-up*” para eliminar interferentes e/ou aumentar a concentração em alcalóides pirrolizidínicos para a análise^{13,16}. A relativa polaridade das formas em que APs se apresentam viabiliza a deslipidificação por tratamento com solventes apolares (*n*-pentano ou éter de petróleo), reduzindo interferências nos procedimentos analíticos seguintes¹³. Este processo de “*clean-up*” pode ser realizado numa fase mais tardia da preparação da amostra, submetendo os extratos aquosos ácidos a partilhas líquido-líquido com solvente não polar, como o diclorometano¹³. Sabe-se que as condições de extração podem afetar a estabilidade dos APs, bem como o rácio de concentrações entre as formas N-óxidos e as bases¹³. Assim, as condições de extração devem ser avaliadas e validadas em função das diferentes matrizes¹³.

Atualmente a extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*)^{13,14,16} com diferentes tipos de polímeros tem sido bem-sucedida nos processos de *clean-up* de extratos vegetais para análises vestigiais de APs¹³. Como exemplos dos cartuchos usados temos o Chem Elut ou Extrelut, de terra de diatomáceas inerte, tais como cartuchos com fases não polares, como octisilano (C₈) ou octadecilsilano (C₁₈)³⁸,

Os métodos tradicionais de SPE apresentam algumas limitações como baixa especificidade, custo elevado e consumo significativo de solventes orgânicos^{16,39}. Contudo, tais limitações são ultrapassadas pelas apresentações SPME (“*Solid Phase Microextraction*”), que necessitam de menor quantidade de amostra, exigem menor quantidade de solventes e reduzem o tempo de processamento^{16,40}. O uso de SPME ainda se encontra em fase de avaliação e validação⁴⁰, no entanto é evidente o seu potencial na preparação de amostras para determinação de quantidades vestigiais de APs em matrizes complexas¹⁶. Parte da limitação no

uso desta apresentação deve-se ao reduzido número de opções para revestimento de fibras, que, atualmente, são apenas polidimetilsiloxano, poliacrilato, divinilbenzeno e respectivos compósitos¹⁶.

Também polímeros de troca iônica SCX (“*Strong Cation Exchange*”) têm sido usados, com sucesso, na preparação de amostras a partir de matrizes e com características muito distintas dos extratos vegetais, tais como o mel¹³. Cartuchos Bond Elut SCX (Agilent), Bekolut SCX (Bekolut), Strata-X-C *polymeric strong cation* (Phenomenex) são alguns exemplos de cartuchos já usados em processos de *clean-up* de amostras com APs¹⁴. A maior vantagem da SCX-SPE é a possibilidade de eluição seletiva tanto os APs na forma terciária como na forma de N-óxidos^{13,38}.

4.2. ANÁLISE

A avaliação de contaminações por alcalóides pirrolizidínicos obriga à utilização de métodos analíticos com elevada sensibilidade e limites de detecção e de quantificação compatíveis adequados ao caráter vestigial destas análises⁴.

Os espectros de absorção no ultravioleta (UV) da maioria dos APs mostram um pico de absorção máxima a 214 nm o que, do ponto de vista analítico, exclui a espectrofotometria UV/Vis das opções para detecção e quantificação de alcalóides pirrolizidínicos. A detecção por espectrometria de massa, em linha com separação cromatográfica de alta eficiência, é, atualmente, a opção de eleição para detecção de APs¹³.

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) foi a metodologia hifenada, pioneira na determinação de alcalóides pirrolizidínicos¹³. Associa a simplicidade e robustez do acoplamento do cromatógrafo para fase gasosa com a elevada eficiência das separações, com a sensibilidade da detecção, e com a reprodutibilidade na aquisição de espectros proporcionada pelos modernos detetores seletivos de massa. No entanto, às vantagens da GC-MS opõem-se as limitações decorrentes da reduzida volatilidade de alguns alcalóides, em particular dos N-óxidos que acabam por sofrer termodegradação, nas condições de injeção¹³. Como já foi referido, nas células e órgãos vegetais que acumulam APs, estes ocorrem, maioritariamente na forma oxidada⁴¹, pelo que os processos analíticos têm que poder evidenciá-los e quantificá-los em favor do rigor e de informações corretas para a avaliação de risco⁴¹. Para assegurar a detecção de alcalóides na forma de N-óxidos é necessário garantir a volatilidade, procedendo, previamente, à sua redução às formas terciárias (voláteis), por hidrogenação catalítica com pó de zinco em solução aquosa ácida¹³. Os resultados da análise refletem a totalidade dos alcalóides pirrolizidínicos, contudo, sem discriminar os que ocorrem

sob a forma de bases terciárias e os que ocorrem na forma de N-óxidos¹³. Essa limitação pode ser ultrapassada por análise diferencial relativa a uma segunda alíquota da amostra em que se omite o passo de redução catalítica¹³. A diferença na quantificação dos alcalóides pirrolizidínicos apurada pelos resultados das análises às alíquotas, corresponde à quantidade de alcalóides na forma de N-óxidos presentes na amostra¹³. A cromatografia líquida (LC) de alta eficiência não tem limitações no que respeita à deteção simultânea de APs na forma de base terciária e na forma oxidada, resultando em análises rápidas e eficientes, com menor risco de alteração dos analitos e consequente produção de artefactos¹³. A metodologia mais comum baseia-se no acoplamento Cromatografia Líquida / Espectrometria de Massa Bidimensional (LC-MS/MS – *Liquid Chromatography-(tandem) mass spectrometry*) com limites de quantificação de aproximadamente 1 µg/Kg (ou inferiores)^{5,13}.

Os espectros de massa das necinas, e consequentemente dos alcalóides com o mesmo padrão de esterificação apresentam espectros de massa iguais ou muito semelhantes pelo que, a sua identificação requer a avaliação da retenção cromatográfica, ou seja, a disponibilidade de padrões de referência. Quando o objetivo da análise se limita à despistagem e quantificação de APs, por exemplo, no suporte a uma análise de risco, a identificação individual de cada alcalóide é supérflua. Nesses casos, onde é a quantificação que releva, esta poderá ser suportada por retas de calibração construídas com soluções de um único padrão de referência^{8,13,14,42}.

O novo método adotado pela Farmacopeia Europeia para determinação de APs usa a cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (LC-MS)³⁶, adequada à determinação dos alcalóides pirrolizidínicos alvo em diversas matrizes^{3,36}. Não obstante, a descrição desse método, a Farmacopeia não exclui a possibilidade de uso de qualquer outro método cromatográfico acoplado com espectrometria de massa ou espectrometria de massa de alta resolução, desde que respeite as especificações descritas sejam respeitadas³⁶. É responsabilidade do analista garantir o cumprimento dessas especificações em, pelo menos, uma matriz representativa de cada grupo de matrizes a analisar⁶. Assim que determinado procedimento evidencie cumprir os requisitos de validação para uma determinada matriz, por exemplo “folha seca de hortelã-pimenta”, assume-se que o procedimento é válido para outra matriz dentro do mesmo grupo, por exemplo “folha”^{6,36}. Esta generalização não dispensa a realização de testes para confirmação da validade do método^{3,6,36}. Usando o exemplo acima em que o método é válido para qualquer amostra de “folha”, será necessário verificar se os requisitos de verificação são respeitados com amostras de folhas secas da espécie em análise (por exemplo, “folha seca de uva-ursina”)⁶.

5. CONCLUSÃO

A informação descrita ao longo deste trabalho retrata os perigos da contaminação por APs e reforça a importância do desenvolvimento de métodos cada vez mais sensíveis e de projetos inovadores que visem a resolução deste problema que, apesar de décadas de estudo, continua a representar uma ameaça para a segurança dos consumidores, pelo facto de muito continuar por se descobrir.

Revela, também, a urgência na implementação de medidas desde os primeiros passos de produção, quer de HMPs, quer de outros géneros alimentícios, para que a exposição a estas fitotoxinas seja reduzida para valores substancialmente mais baixos^{3,6,36}, uma vez que já foram atingidos níveis críticos de exposição, resultantes do consumo de alguns alimentos¹⁴ e o conhecimento atual poderá representar, apenas, a parte visível do iceberg que é a problemática descrita. Apesar da informação desconhecida e de dados que ainda padecem de validação científica, o risco de intoxicações crónicas é elevado e as consequências são sérias, tratando-se, assim, de uma ameaça, pelo que, para bem da segurança, humana e animal, é importante que se continuem a reunir esforços na procura de soluções. O Farmacêutico poderá constituir uma peça chave, uma vez que ao ser um agente de saúde pública altamente qualificado, poderá atuar em várias frentes, desde a integração em projetos de investigação inovadores, ao desenvolvimento de ações de sensibilização nos mais diversos meios.

Considerando que grande parte da exposição resulta da alimentação, este poderá revelar-se um desafio para agricultores e produtores, em que a identificação e redução de espécies produtoras de APs e a quantificação precisa nos produtos finais estão dificultadas. Este desafio tem repercussões graves, por exemplo, em comunidades rurais em que culturas podem facilmente exceder os limites de APs permitidos e a presença indesejada de plantas infestantes em pastos pode provocar perdas substanciais de gado^{5,13}.

Os comportamentos e medidas atuais no combate a esta contaminação têm de ser repensados e estratégias têm de ser delineadas de modo a que todos os envolvidos na produção estejam informados do risco e do modo de atuação. Estabelecer contactos com organizações governamentais locais e nacionais poderá ser um passo importante a dar¹⁷ ao nível da divulgação de informação fidedigna e/ou disponibilização de outras ferramentas, como formações dadas, como referido acima, por Farmacêuticos. Não pode, no entanto, deixar de existir um cuidado na adaptação do tipo de recomendações às entidade em questão¹⁷, de modo a aumentar a aderência a estas práticas.

A criação de uma base de dados com a descrição das características das espécies vegetais conhecidas por produzirem alcalóides pirrolizidínicos representará um enorme avanço no combate da contaminação por alcalóides pirrolizidínicos, num mundo cada vez mais

“*data-driven*” e que luta pela interligação de conhecimentos de diferentes áreas por todo o mundo. Este poderá ser um projeto impulsionador para o desenvolvimento de manuais destinados, por exemplo, a agricultores, onde podem encontrar um resumo da problemática, descrição da planta, acompanhada de fotografias ou imagens, a necessidade de agir, como e onde atuar, de maneira prática e informativa. O desenvolvimento de aplicativos capazes de detetar plantas infestantes em campos de cultivo ou pastos poderá, também, ser outro projeto interessante numa altura em que presenciamos um fenómeno de transformação digital na Indústria, aproveitando o facto de que as novas tecnologias constituem, cada vez mais, ferramentas intuitivas e fáceis de usar, para além do custo substancialmente mais baixo comparativamente a um passado não muito distante.

A integração de novos métodos de trabalho, associados às novas tecnologias, e a aposta na formação de profissionais poderão abrir novos horizontes no controlo e/ou resolução de problemas de saúde pública como a contaminação por APs, problemas estes que permitem à classe farmacêutica mostrar a sua versatilidade, atuando em áreas que, nem sempre, são facilmente associadas à sua profissão mas cuja importância do seu papel é inegável.

REFERÊNCIAS

1. Moreira R, Pereira DM, Valentão P, Andrade PB. Pyrrolizidine alkaloids: Chemistry, pharmacology, toxicology and food safety. *Int J Mol Sci.* (2018);19(6). doi:10.3390/ijms19061668
2. Tamariz J, Burgueño-tapia E, Vázquez MA, Delgado F. Pyrrolizidine Alkaloids. (2018). doi:10.1016/bs.alkal.2018.03.001
3. European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. Ph . Eur . seeks feedback on new general chapter on pyrrolizidine alkaloids. 2019.
4. HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products) - European Medicines Agency (EMA). Public statement on contamination of herbal medicinal products / traditional herbal medicinal products with pyrrolizidine alkaloids Transitional recommendations for risk management and quality control. (2016);44(May):1–11.
5. Steinhoff B. Pyrrolizidine alkaloid contamination in herbal medicinal products : Limits and occurrence. *Food Chem Toxicol.* 2019;130(September 2018):262–266. doi:10.1016/j.fct.2019.05.026
6. 32.1 P. Pharmeuropa archives Texts for comment 32 . I. (2020);(January).
7. Schramm S, Köhler N, Rozhon W. Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules.* 2019;2(Figure 1):1–44. doi:10.3390/molecules24030498
8. Avula B, Sagi S, Wang Y, Zweigenbaum J, Wang M, Khan IA. Characterization and Screening of Pyrrolizidine Alkaloids and N-oxides from Botanicals and Dietary Supplements using UHPLC-High Resolution Mass Spectrometry. *FOOD Chem.* (2015). doi:10.1016/j.foodchem.2015.01.053
9. Klevenhusen F, Pieper R, Winter J, Speer K. Stability of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vernalis* in grass silage under different ensilage conditions. (2019);(August). doi:10.1002/jsfa.9963
10. Ober D, Hartmann T. Phylogenetic origin of a secondary pathway: The case of pyrrolizidine alkaloids. *Plant Mol Biol.* (2000);44(4):445–450. doi:10.1023/A:1026597621646
11. Skoneczny D, Zhu X, Weston PA, Gurr GM, Callaway RM, Weston LA. Production of pyrrolizidine alkaloids and shikonins in *Echium plantagineum* L . in response to various plant stressors. (2019);(March). doi:10.1002/ps.5540
12. Picron J, Herman M, Hoeck E Van, Gosciny S. Analytical strategies for the determination of pyrrolizidine alkaloids in plant based food and examination of the transfer rate during the infusion process . *Food Chem.* (2018).

doi:10.1016/j.foodchem.2018.06.055

13. European Food Safety Authority (EFSA) Journal. Scientific Opinion on Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Feed. (2011);9(11):1–134. doi:10.2903/j.efsa.
14. Kaltner F, Stiglbauer B, Rychlik M, Gareis M, Gottschalk C. Development of a sensitive analytical method for determining 44 pyrrolizidine alkaloids in teas and herbal teas via LC-ESI-MS / MS. *Anal Bioanal Chem.* (2019).
15. Hersteller A-, Manufacturers GM, Industrie P. Code of practice to prevent and reduce pyrrolizidine alkaloid contaminations of medicinal products of plant origin. (2013).
16. Luo Z, Chang C, Chen G, et al. Molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction coupled with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for rapid analysis of pyrrolizidine alkaloids in herbal medicine. (2019);(July):1–11. doi:10.1002/jssc.201900665
17. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization. Code of Practice for Weed Control to Prevent and Reduce Pyrrolizidine Alkaloid Contamination in Food and Feed. *Codex Aliment.* (2014).
18. Cunha A da, Batista MT. Farmacognosia e fitoquímica. Em: *Farmacognosia e fitoquímica.* ; (2005).
19. European Food Safety Authority (EFSA) Journal. Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey , tea , herbal infusions and food supplements. (2017);15(June). doi:10.2903/j.efsa.2017.4908
20. European Medicines Agency (EMA). Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) Table of conten. (2014).
21. Gottschalk C, Ronczka S, Preiß-weigert A, et al. Pyrrolizidine alkaloids in natural and experimental grass silages and implications for feed safety. *Anim Feed Sci Technol.* 2015;207:253–261. doi:10.1016/j.anifeedsci(2015).06.014
22. Hartmann T. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta.* (1999):483–495.
23. Wesseling A, Demetrowitsch TJ, Schwarz K, Ober D. Variability of Pyrrolizidine Alkaloid Occurrence in Species of the Grass Subfamily Pooideae (Poaceae). 2017;8(November):1–8. doi:10.3389/fpls.(2017).02046
24. Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine Alkaloids — Genotoxicity , Metabolism Enzymes , Metabolic Activation , and Mechanisms. (2004);36(1):1–55. doi:10.1081/DMR-120028426
25. Merz K, Schrenk D. Interim Relative Potency Factors for the Toxicological Risk

- Assessment of Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Herbal Medicines. *Toxicol Lett.* 2016. doi:10.1016/j.toxlet.(2016).05.002
26. Robertson J, Stevens K. Pyrrolizidine alkaloids: Occurrence, biology, and chemical synthesis. *Nat Prod Rep.* (2017);34(1):62–89. doi:10.1039/c5np00076a
 27. Ruan J, Yang M, Fu P, Ye Y, Lin G. Metabolic activation of pyrrolizidine alkaloids: Insights into the structural and enzymatic basis. *Chem Res Toxicol.* (2014);27(6):1030–1039. doi:10.1021/tx500071q
 28. Steinhoff B. Challenges in the quality of herbal medicinal products with a specific focus on contaminants. *Phytochem Anal.* (2019);(July):1–7. doi:10.1002/pca.2879
 29. Allemang A, Mahony C, Lester C, Pfuhrer S. Relative potency of fifteen pyrrolizidine alkaloids to induce DNA damage as measured by micronucleus induction in HepaRG human liver cells. *Food Chem Toxicol.* (2018). doi:10.1016/j.fct.2018.08.003
 30. European Medicines Agency (EMA). Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic , unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs) Table of conten. (2013);44(October 2012):1–21.
 31. Selmar D, Wittke C, Wolffersdorff IB, Klier B, Nowak M. Transfer of pyrrolizidine alkaloids between living plants : A disregarded source of contaminations. *Environ Pollut.* 2019;248:456–461. doi:10.1016/j.envpol.(2019).02.026
 32. Selmar D, Abouzeid S, Radwan A, et al. Horizontal Natural Product Transfer : A Novel Attribution in Allelopathy. *Phytochemistry.* (2018).
 33. JR RAC. *Pyrrolizidine Alkaloids in Foods I . Introduction.* Vol 45.; (2003).
 34. HMPC (Committee on Herbal Medicinal Products) - European Medicines Agency (EMA). Guideline on Good Agricultural and Collection Practice (GACP) for Starting Materials of Herbal Origin. (2006);(February).
 35. Mulder PPJ, Sanchez PL, Bodi D, Ronczka S, Preiß-weigert A, These A. Occurrence of pyrrolizidine alkaloids in animal- and plant-derived food: Results of a survey across Europe. *Food Addit Contam Part A.* (2017);0(0). doi:10.1080/19440049.2017.1382726
 36. ECA Academy. Ph . Eur . Draft Chapter for PA Contaminants in Herbal Drugs.
 37. BfR (Bundesinstitut für Risikobewertung). Determination of pyrrolizidine alkaloids (PA) in plant material by SPE-LC-MS / MS. (2014).
 38. Crews C, Berthiller F, Krska R. Update on analytical methods for toxic pyrrolizidine alkaloids. *Anal Bioanal Chem.* (2010):327–338. doi:10.1007/s00216-009-3092-2
 39. Peltenburg H, Groothuis FA, Droge STJ, Bosman IJ, Hermens JLM. Elucidating the sorption mechanism of “ mixed-mode ” SPME using the basic drug amphetamine as a

- model compound. *Anal Chim Acta*. (2013);782:21–27. doi:10.1016/j.aca.2013.04.030
40. Regina W, Mauro F. Extração em Fase Sólida (SPE) e Micro Extração em Fase Sólida (SPME) de Piretróides em Água. *Quim Nov*. 2001;24(2):172–175.
41. Cao Y, Colegate SM, Edgar JA. Safety Assessment of Food and Herbal Products Containing Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids: Interlaboratory Consistency and the Importance of N -oxide Determination. *Phytochem Anal*. (2008);533(July):526–533. doi:10.1002/pca.1079
42. Gottschalk C, Huckauf A, Dübecke A, et al. Uncertainties in the determination of pyrrolizidine alkaloids levels in naturally contaminated honeys and comparison of results obtained by different analytical approaches. *Food Addit Contam Part A*. (2018);0(0). doi:10.1080/19440049.2018.1468929

ANEXO

Tabela I. Espécies usadas para fins medicinais com alcalóides pirrolizidínicos. Adaptada da referência¹.

Família	Espécie
Apocynaceae	<i>Amphineurion marginatum</i> (Roxb.) D. J. Middleton; <i>Alafia</i> cf. <i>caudata</i> Stapf.
Asteraceae	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.; <i>Adenostyles alliariae</i> (Gouan) Kern; <i>Emilia sonchifolia</i> (L.) DC.; <i>Petasites hybridus</i> (L.) PH Gaertn., B. Mey & Scherb.; <i>Petasites spurius</i> (Retz) RCHB; <i>S. jacobaea</i> ; <i>Senecio vulgaris</i> L.; <i>T. farfara</i> ; <i>Senecio nemorensis</i> L.; <i>Ageratum conyzoides</i> L.; <i>Chromolaena odorata</i> (L.) R. M. King & H. Rob.; <i>Eupatorium chinense</i> L.; <i>Eupatorium fortunei</i> Turcz.; <i>Eupatorium japonicum</i> Thunberg ex Murray.; <i>Cacalia hastata</i> L.; <i>Cacalia hupehensis</i> Hand.-Mazz.; <i>Crassocephalum crepidioides</i> (Benth.) S. Moore; <i>Farfugium japonicum</i> (L.) Kitam.; <i>Gynura bicolor</i> (Roxb. ex Willd.) DC.; <i>Gynura divaricata</i> (L.) DC.; <i>G. segetum</i> ; <i>Ligularia dentata</i> (A.Gray) Hara; <i>Petasites japonicus</i> (Siebold & Zucc.) Maxim.; <i>Senecio argunensis</i> Turcz.; <i>Senecio integrifolius</i> (L.) Clairv.; <i>Senecio scandens</i> Buch.-Ham. Ex D. Don; <i>Syneilesis aconitifolia</i> (Bunge) Maxim.; <i>Matricaria chamomilla</i> L.; <i>Gynura pseudochina</i> (L.) DC.; <i>Gynura japonica</i> (Thunb.) Juel; <i>Packera candidissima</i> (Greene) W. A. Weber & Á. Löve; <i>Solanecio mannii</i> (Hook.f.) C. Jeffrey; <i>Solanecio tuberosus</i> (Sch. Bip. ex A. Rich.) C. Jeffrey var. <i>tuberosus</i> ; <i>Bidens pilosa</i> L.; <i>Senecio longilobus</i> Benth.
Boraginaceae	<i>Alkanna tinctoria</i> (L.) Tausch; <i>Anchusa officinalis</i> L.; <i>Borago officinalis</i> L.; <i>Cynoglossum officinale</i> L.; <i>Heliotropium arborescens</i> L.; <i>Lithospermum officinale</i> L.; <i>Myosotis scorpioides</i> L.; <i>Symphytum asperum</i> Lepech; <i>Symphytum caucasicum</i> Bieb.; <i>Symphytum officinale</i> L.; <i>Symphytum tuberosum</i> L.; <i>Symphytum x uplandicum</i> Nyman; <i>Arnebia euchroma</i> (Royle) I. M. Johnst.; <i>Cordia myxa</i> L.; <i>Cynoglossum amabile</i> Stapf & J. R. Drumm; <i>Cynoglossum lanceolatum</i> Forssk.; <i>Cynoglossum zeylanicum</i> (Vahl) Brand; <i>Cynoglossum grande</i> Dougl. ex Lehm.; <i>Cynoglossum virginianum</i> L.; <i>Arnebia benthamii</i> (Wall. ex G.Don.) Johnst.; <i>H. indicum</i> ; <i>Lappula intermedia</i> (Ledeb.) Popov; <i>Lithospermum erythrorhizon</i> Siebold & Zucc.
Fabaceae	<i>Crotalaria albida</i> Roth; <i>Crotalaria assamica</i> Benth.; <i>Crotalaria pallida</i> Aiton; <i>Crotalaria sessiliflora</i> L.; <i>Crotalaria tetragona</i> Andrews.
Orchidaceae	<i>L. nervosa</i> .