



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

José Daniel Mota Rodrigues

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Impacto do nitrato e nitrito na saúde humana: um novo paradigma em evolução” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Catarina Madanêlo, do Dr. João Maia e da Professora Doutora Bárbara Rocha e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

José Daniel Mota Rodrigues

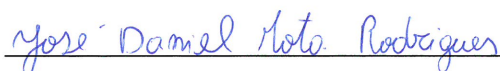
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Impacto do nitrato e nitrito na saúde humana: um novo paradigma em evolução" referente à Unidade Curricular "Estágio", sob orientação da Dra. Catarina Madanêlo, do Dr. João Maia e da Professora Doutora Bárbara Rocha apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2020

Eu, José Daniel Mota Rodrigues, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015228367, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Impacto do nitrato e nitrito na saúde humana: um novo paradigma em evolução” 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 informação 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, 29 de setembro de 2020.



(José Daniel Mota Rodrigues)

“It is good to have an end to journey toward, but it is the journey that matters in the end.”

- Ernest Hemingway

Agradecimentos

Ao meu pai e à minha mãe por todo o amor, paciência e confiança durante todos estes anos.

À minha irmã pelo apoio incondicional, palavras de motivação e todos os conselhos.

À Imperial TAFFUC por ser uma segunda família e por todas as memórias criadas.

A todas as amizades que ganhei, pelas histórias e momentos partilhados.

À Professora Doutora Bárbara Rocha pela ajuda e apoio constante durante esta etapa final.

À Dra. Catarina Madanêlo e toda a equipa do departamento de Assuntos Regulamentares da Bluepharma pela oportunidade, profissionalismo e conhecimento transmitido.

Ao Dr. João Maia e toda a equipa da Farmácia Machado pela oportunidade, amizade e sabedoria transmitida.

A Coimbra, por ser sempre um porto de abrigo.

Um obrigado!

Índice

Parte I - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	8
Introdução	9
A Bluepharma	10
Análise SWOT	11
Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	12
Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	14
Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	15
Ameaças (<i>Threats</i>).....	16
Conclusão.....	17
Referências Bibliográficas	18

Parte II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	20
Introdução	21
Análise SWOT	22
Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	23
Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	25
Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	26
Ameaças (<i>Threats</i>).....	27
Conclusão.....	28

Parte III - Monografia "Impacto do nitrato e nitrito na saúde humana: um novo paradigma em evolução"

Lista de Abreviaturas	31
Abstract.....	32
Resumo	33
1. Introdução.....	34
2. A origem do nitrato no organismo humano	35
3. Riscos do consumo de nitrato para a saúde humana.....	37
4. A evolução de um novo paradigma: via do Nitrato-Nitrito-Óxido nítrico.....	40
5. Efeitos fisiológicos do nitrato da dieta: potenciais aplicações terapêuticas	45
5.1- Sistema digestivo	45
5.1.1- Estômago.....	45

5.1.2 - Cavidade oral.....	46
5.2 - Sistema cardiovascular	46
5.2.1 - Pressão arterial.....	46
5.2.2 - Função endotelial.....	47
5.2.3 - Rigidez arterial.....	47
5.2.4 -Função plaquetária.....	48
5.3 - Sistema nervoso central	49
5.3.1 - Corrente sanguínea cerebral e função cognitiva.....	49
5.4 - Efeitos metabólicos.....	49
5.4.1 - Consumo de oxigênio e exercício físico	49
6. Efeitos terapêuticos e fisiológicos do nitrato produzido endogenamente.....	50
7. Conclusão	50
8. Referências Bibliográficas.....	52

PARTE I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica Assuntos Regulamentares, Bluepharma



Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

AR – Assuntos Regulamentares

FDA – *Food and Drug Administration*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

HPAPI – Substâncias Ativas de Elevada Atividade Farmacológica.

I&D- Investigação e Desenvolvimento

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

RCM – Resumo das Características do Medicamento

RH – Recursos Humanos

UC – Universidade de Coimbra

SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus 2

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*

Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), pelo seu extenso plano curricular nas mais diversas áreas da saúde e do medicamento durante os seus 5 anos, apresenta-se como um curso com um grau elevado de abrangência nas carreiras profissionais que se podem seguir.

Um farmacêutico, ao ser um agente do medicamento, deverá ter conhecimento necessário para compreender e trabalhar em qualquer área que esteja incluída no ciclo de vida do medicamento e não apenas na fase final, aquando a sua venda aos utentes. Como agente profissional de saúde, o farmacêutico tem a capacidade de exercer profissionalmente em áreas como Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar (onde a ligação aos utentes é mais próxima), ou em áreas mais relacionadas com o desenvolvimento de medicamentos, tais como, Ensaios Clínicos, Controlo e Garantia de Qualidade, Produção, Assuntos Regulamentares, entre outros. Assim, após a conclusão do MICF, os recém-formados devem deter todo o conhecimento teórico e prático necessário para exercer funções em qualquer fase do ciclo de vida do medicamento. Isto permite ao MICF destacar-se como um dos cursos mais polivalentes da Área da Saúde e da Universidade de Coimbra (UC).

Devido ao facto de a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) permitir que os seus alunos realizem um estágio além daquele em Farmácia Comunitária (obrigatório) ou Farmácia Hospitalar (opcional), consegui realizar um estágio numa empresa farmacêutica – a Bluepharma – após uma entrevista disponibilizada aos alunos finalistas do MICF. Este estágio desenvolveu-se no departamento de Assuntos Regulamentares, sob a orientação da Dra. Catarina Madanêlo, durante um período de 4 meses. Noto que os primeiros três meses foram acordados entre a faculdade e a Bluepharma e o quarto mês foi realizado após uma proposta da empresa, uma vez que nos encontrávamos no Estado de Emergência (devido ao SARS-CoV-2) e os estágios em Farmácia Comunitária estavam suspensos.

Na Bluepharma, o departamento de Assuntos Regulamentares (AR) tem como principal função assegurar a correta regulamentação dos seus produtos farmacêuticos, de forma a se conseguir obter uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM). Para isto, cabe ao departamento e aos seus colaboradores manterem um conhecimento atualizado acerca das diretrizes de cada autoridade, pois estes requisitos variam de país para país e vão sendo alterados ao longo do tempo.

Para além deste papel de ligação entre a empresa e as autoridades, o departamento de AR também exerce outra função de enorme importância que é o contacto com os clientes da empresa. Todas estas funções obrigam o departamento de AR a ter um constante contacto com os outros departamentos da empresa, de forma a esclarecer qualquer assunto relacionado com as diferentes fases do ciclo de vida do medicamento.

A Bluepharma

A Bluepharma é uma empresa farmacêutica (com sede em Coimbra), que durante os seus 19 anos de existência (teve o início da sua atividade em fevereiro de 2001) passou de uma unidade industrial com 58 colaboradores focados no mercado nacional, para um grupo de 18 empresas com cerca de 700 colaboradores. Com este crescimento o foco de trabalho passou a ter um carácter internacional, tendo a empresa, em 2019, exportado 87% da sua produção para mais de 40 países e criado 4 delegações em 4 países, nomeadamente, em Espanha, Angola, Moçambique e Estados Unidos da América (*in BLUEPHARMA, 2020*).

A Bluepharma desenvolve as suas atividades em três áreas: produção de medicamentos próprios e para terceiros; investigação, desenvolvimento e registo de medicamentos; comercialização de medicamentos genéricos. Podemos assim concluir que a área de atividade da empresa abrange todo o ciclo de vida do medicamento, desde primeiro passo na Investigação e Desenvolvimento (I&D) até ao último que é o mercado (*in BLUEPHARMA, 2020*).

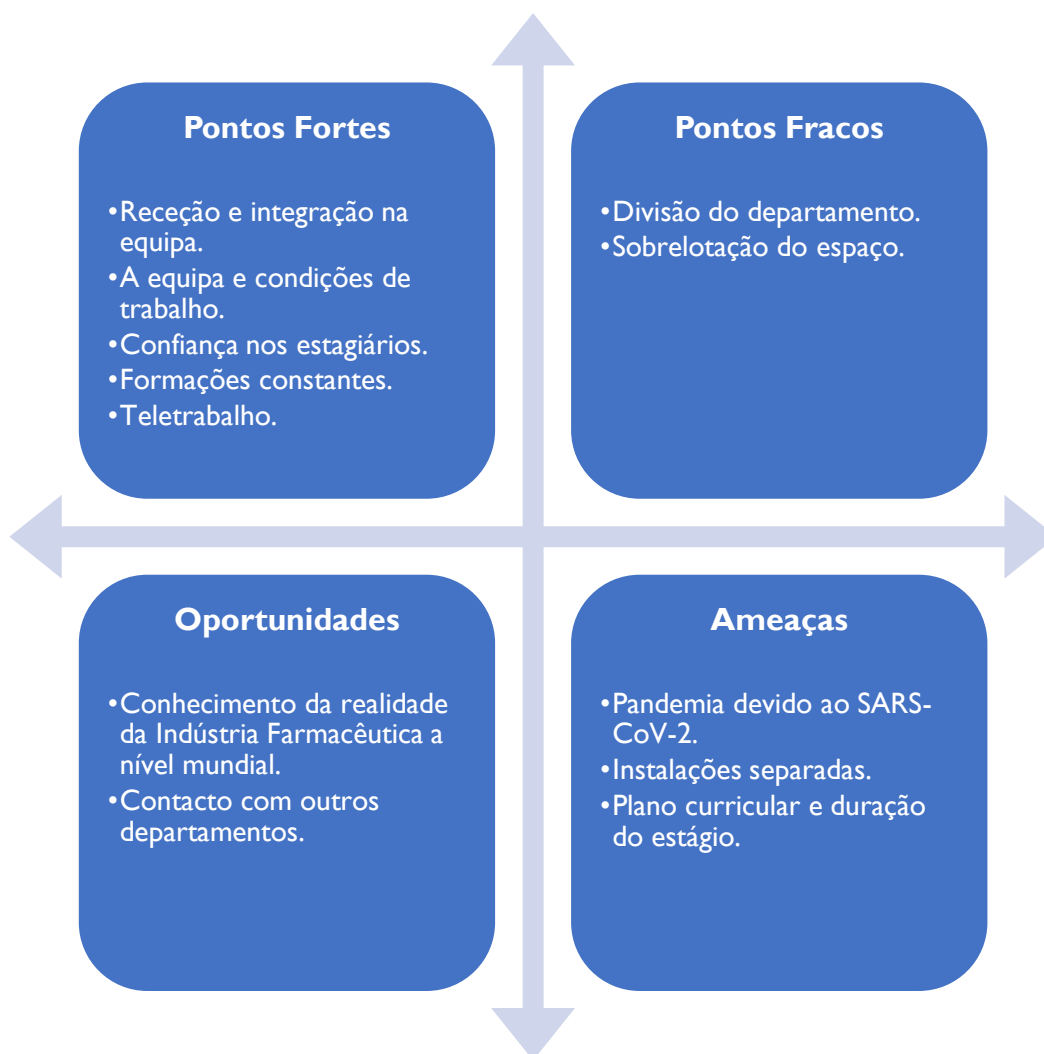
É importante referir que, devido à qualidade nos seus serviços e à vasta experiência no setor farmacêutico, o grupo Bluepharma é um dos grupos mais empreendedores e inovadores na sua área quer a nível nacional, mas também internacional. É de salientar que a Bluepharma foi a primeira empresa portuguesa a obter a certificação por parte da *Food and Drug Administration* (FDA) para o desenvolvimento e produção de formas sólidas e a poder exportá-las para o mercado norte-americano (*in BLUEPHARMA, 2020*).

Até 2030 a Bluepharma tem o objetivo de criar novas instalações em Eiras, de forma a aumentar a sua capacidade tecnológica e recursos humanos para continuar o seu crescimento, e também para ser capaz de realizar a produção de medicamentos que incorporam substâncias ativas de elevada atividade farmacológica (HPAPI). Este crescimento tem o objetivo de colocar a empresa em novos mercados, aumentar o número de empregos e reforçar a posição da Bluepharma como uma empresa farmacêutica de referência. Estes objetivos estão inseridos

no programa “Bluepharma Acelera 2030” onde serão investidos cerca de 47 milhões de euros (in BLUEPHARMA, 2020).

Análise SWOT

Com o intuito de fornecer uma perspetiva pessoal acerca do meu estágio irei apresentar uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*) onde apresentarei os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças com os quais me deparei até ao término do meu estágio no departamento de AR na Bluepharma.



Pontos Fortes (Strengths)

- **Receção e integração na equipa**

No meu primeiro dia de estágio, dirigi-me à sede da empresa, em S. Martinho do Bispo, onde, juntamente com os restantes estagiários, fui recebido pelo departamento de Recursos Humanos (RH). Após uma breve apresentação entre todos e de uma palestra de acolhimento ministrada pelo Dr. Paulo Barradas Rebelo (presidente da Bluepharma), realizámos uma visita guiada às instalações da empresa onde foi feita uma pequena interação com cada um dos departamentos. A meu ver, este contacto inicial com toda a empresa foi muito importante pois, para além de ficar a conhecer a empresa, também foi possível conhecer pessoas de cada departamento que nos deram as boas-vindas e incentivaram para a plena realização do estágio. Esta interação fez com que me sentisse bem recebido e também facilitou o contacto com algumas pessoas de outros departamentos durante o percurso do meu estágio.

O departamento onde estagiei – departamento de AR – não se localiza na sede da empresa, mas sim numa ramificação situada em Taveiro. Por este facto, só no meu segundo dia é que conheci o departamento onde iria estagiar, mas a receção foi de igual modo feita com a maior simpatia e profissionalismo. Através de uma pequena apresentação individual entre mim e os colaboradores, fiquei a conhecer todos aqueles com quem iria trabalhar durante os meses seguintes e todos eles demonstraram total disponibilidade para me ajudar e esclarecer qualquer questão que surgisse na realização das minhas tarefas.

- **A equipa e condições de trabalho**

Um dos pilares para o sucesso de qualquer empresa é a sua equipa e a Bluepharma não é exceção. A qualidade e a formação dos colaboradores são uma das prioridades no seu recrutamento e estas qualidades foram facilmente perceptíveis no início do meu estágio. No departamento de AR todos os colaboradores têm ao seu encargo determinadas tarefas individuais como, por exemplo, o acompanhamento regulamentar de moléculas (desde a realização de alterações que sejam necessárias para a sua manutenção no mercado, mas também o esclarecimento de alguma dúvida regulamentar por parte de outro departamento acerca dessa molécula). Para além disso, mensalmente, é realizada uma formação interna onde um colaborador aborda um tema em que tenha mais conhecimento/experiência, de forma a ajudar os restantes colaboradores, caso estes um dia se deparem com uma situação que

envolva esse tema. Isto permite aumentar o nível de conhecimento e qualidade de trabalho de todo o departamento.

De forma a complementar o trabalho dos seus colaboradores, a Bluepharma providencia condições de trabalho exemplares como o excelente estado das instalações, a existência de uma cantina na seda da empresa, zonas específicas para pequenas refeições entre horários com alguns produtos gratuitos (fruta e café) e a disponibilização de material de trabalho individual para os colaboradores, como computadores e outros componentes eletrónicos.

- **Confiança nos estagiários**

Nos meus primeiros dias de estágio, a minha função passou maioritariamente por estudar diretrizes e *guidelines* acerca do método de funcionamento da empresa e, também, sobre algumas entidades com a qual a empresa trabalha. Este estudo foi sem dúvida importante para a criação de bases acerca desta matéria e para a aquisição de conhecimento fundamental para as tarefas que realizei daí em diante. Após o término deste estudo, executei tarefas indicadas não só pela Dra. Catarina Madanêlo como, por exemplo, a revisão de legislação interna, a elaboração de um Resumo das Características de um Medicamento (RCM), a atualização da *database* das moléculas da empresa, mas também pelos restantes colaboradores que, por vezes, precisavam de algum suporte adicional na preparação de alguma documentação ou na preparação de *dossiers* para a obtenção de uma AIM. Estas tarefas foram realizadas de forma independente, tendo a equipa sempre disponível para auxiliar no esclarecimento de alguma dúvida que surgisse. No final de cada tarefa, esta era avaliada por um colaborador mais experiente de forma a verificar se seria necessária alguma correção/alteração. Este método de trabalho foi, sem dúvida, um ponto forte no meu estágio, pois permitiu-me trabalhar de maneira autónoma e pôs à prova as minhas capacidades, demonstrando a confiança que o departamento deposita nos seus estagiários.

- **Formações constantes**

O facto de haver um plano de formações constantes desenvolvido pela empresa foi, a meu ver, um dos pontos mais fortes e uma grande mais-valia para o meu desenvolvimento. Este plano abarcava formações que eram direcionadas para os novos colaboradores de todos os departamentos, sendo estas focadas no método de funcionamento da empresa e nas suas políticas como, por exemplo, “eCTD- Conceitos Gerais”, “Ambiente, Saúde e Segurança”, “Melhoria Contínua”, entre outras.

Focando as formações internas de cada departamento, noto que estas me permitiram aprender novos conceitos, aplicá-los, e, ao mesmo tempo, solidificar os conhecimentos adquiridos nas unidades curriculares de “Assuntos Regulamentares do Medicamento” e “Gestão de Processos Regulamentares”.

- **Teletrabalho**

A fase final do meu estágio coincidiu com a entrada em Estado de Emergência do nosso país devido à pandemia provocada pelo SARS-CoV-2, que assolou toda a população mundial. Tal situação poderia ter prejudicado o meu estágio, uma vez que este esteve na iminência de terminar antes do previsto. Felizmente, a empresa deu a indicação que eu poderia continuar em teletrabalho e, caso tivesse interesse, poderia ainda prolongar o meu estágio mais um mês. Após um diálogo com alguns membros do departamento, notei que havia interesse por parte da empresa na prorrogação do meu estágio e eu, também, não poderia perder a oportunidade de continuar a aprender e a consolidar todo o conhecimento que tinha adquirido até então. Assim, o meu último mês de estágio foi realizado em teletrabalho, o que me permitiu ter a percepção das diferenças que existem entre esta forma de trabalho e o trabalho presencial, ao nível de uma Indústria Farmacêutica.

Pontos Fracos (Weaknesses)

- **Divisão do departamento**

Dias após a minha chegada ao departamento de AR, foi-me indicado que o departamento iria sofrer mudanças. Previamente, o departamento estava dividido em duas equipas: uma equipa encarregue pelo registo e gestão dos produtos nos territórios europeus e outra equipa responsável pelo registo e gestão de produtos nos restantes territórios. Com esta mudança o departamento dividiu-se, tendo a equipa responsável pelos territórios fora da Europa integrado outro departamento - o departamento de *Compliance*; a equipa responsável pelos territórios europeus continuou no departamento de AR, sendo esta última a equipa onde eu fiquei. É de salientar que a equipa que mudou de departamento também mudou de instalações, tendo mudado para a sede da empresa.

- **Sobrelotação de espaço**

Devido ao constante crescimento exponencial da empresa, consequência do enorme aumento da sua produção, a Bluepharma enfrenta uma ocupação excessiva no que toca a espaço disponível. Considero isto um ponto fraco pois este poderá ser um fator comprometedor para a empresa, no sentido em que poderá comprometer a sua aptidão para responder a mercados de maior dimensão.

Noto que a empresa já está a trabalhar no sentido de resolver este problema com o programa “Bluepharma Acelera 2030”, onde irá construir instalações de maior dimensão, com uma maior capacidade tecnológica.

Oportunidades (*Opportunities*)

- **Conhecimento da realidade da Indústria Farmacêutica a nível mundial**

O MICF é um curso com uma enorme área de abrangência ao nível de saídas profissionais, sendo a área de Indústria Farmacêutica uma das mais atrativas, devido à enorme quantidade de departamentos que esta área tem à sua disposição, e às diferentes tarefas que cada um destes departamentos possui.

Este estágio foi uma oportunidade importantíssima para o meu desenvolvimento como futuro farmacêutico pois permitiu-me perceber o método de funcionamento de uma empresa farmacêutica, o modo de trabalho dos seus colaboradores e a sua posição relativamente a outras entidades. Sendo a Bluepharma uma empresa com prestígio internacional, permitiu-me, também, perceber como o mundo dos Assuntos Regulamentares funciona a nível mundial e como as diferentes empresas operam neste setor.

- **Contacto com outros departamentos**

O departamento de AR está em constante contacto com os restantes departamentos da empresa. Tal facto permitiu-me, de uma maneira geral, conhecer outros departamentos e perceber a maneira de como estes se enquadravam no dia-a-dia da empresa. Esta interação entre departamentos despertou novos interesses sobre possíveis carreiras pelas quais possa enveredar no meu futuro ao nível da Indústria Farmacêutica.

Ameaças (*Threats*)

- **Pandemia devido ao SARS-CoV-2**

Como referi anteriormente, a fase final do meu estágio coincidiu com o pico da pandemia, o que levou o país a entrar em Estado de Emergência. Isto levou muitas empresas a enviarem os seus trabalhadores para casa, por forma a evitar a propagação do vírus.

A Bluepharma, sendo uma empresa farmacêutica, está diretamente relacionada com a saúde da nossa população, não podendo assim parar o seu trabalho. Deste modo, os seus diretores, colocando em primeiro lugar a saúde dos seus colaboradores, permitiram que fosse iniciado um regime de teletrabalho nos departamentos em que fosse possível trabalhar a partir de casa.

Esta situação ameaçou o meu estágio pois, caso não houvesse a possibilidade de estagiar em teletrabalho, teria de terminar o meu estágio antecipadamente.

- **Instalações separadas**

O facto do departamento de AR se situar em Taveiro constitui uma ameaça ao normal funcionamento da empresa. Sendo um departamento que está em constante contacto com outros departamentos, a sua disponibilidade de resposta e capacidade de comunicação são fundamentais para a realização eficaz da sua função. Assim, o facto de o departamento de AR estar localizado num local diferente tornava situações particulares, como a falha no sistema de comunicação interno da empresa ou a necessidade de um encontro presencial entre colaboradores de departamentos diferentes, situações difíceis de resolver.

- **Plano curricular e duração do estágio**

No plano curricular do MICF existem duas unidades curriculares direccionadas para a área de AR, sendo elas a unidade “Assuntos Regulamentares do Medicamento” e a unidade opcional “Gestão de Processos Regulamentares”. Devido à abrangência desta área e à quantidade de conhecimentos necessários para se desenvolver as capacidades de trabalho neste ramo, penso que seria benéfico para os estudantes do MICF terem no seu percurso académico mais unidades curriculares que façam referência a temas abordados na área dos AR. Gostava de realçar que a cadeira opcional de “Gestão de Processos Regulamentares” foi, sem dúvida, uma mais-valia para uma boa realização do meu estágio devido ao conhecimento

teórico adquirido nas aulas e à sua implementação em casos práticos. No entanto, esta é uma unidade opcional fazendo com que nem todos os estudantes tenham acesso a esta.

Conclusão

A Indústria Farmacêutica é uma área caracterizada pela diversidade de carreiras profissionais que pode proporcionar, muito devido às diferentes fases que um produto farmacêutico tem de ultrapassar antes de atingir o mercado farmacêutico.

No meu estágio consegui perceber que o bom desempenho de um departamento de AR é de extrema importância para o funcionamento de qualquer empresa. Isto deve-se à forte e constante interação que o departamento de AR exerce com os outros departamentos da empresa. Grande parte desta interação deve-se ao facto de o departamento de AR funcionar como intermediário entre a empresa e os seus clientes e também ser o ponto de contacto com as autoridades dos diversos países onde a empresa disponibiliza os seus produtos. Os seus colaboradores devem deter um grande espírito de entreajuda, espírito crítico, rigor no seu trabalho e uma enorme capacidade de adaptação que lhes permita executar corretamente a diversidade de tarefas que surgem no seu dia-a-dia.

Noto que este estágio na Bluepharma foi um passo importante nesta etapa final do meu percurso académico pois permitiu-me conhecer a realidade prática do funcionamento de uma empresa farmacêutica (algo que me era desconhecido até então) e descobrir uma nova faceta que o farmacêutico pode assumir na sociedade. Defendo, assim, que todos os futuros estagiários deviam considerar um estágio em indústria, nos diversos departamentos que esta área oferece, de forma a adquirir um novo ponto de vista que pode influenciar a decisão relativamente ao seu futuro profissional.

Não posso terminar sem deixar um agradecimento especial à Dra. Catarina Madanêlo pela oportunidade, apoio e confiança que depositou em mim durante o meu estágio, e a toda a equipa do departamento de AR pelo profissionalismo, conhecimento transmitido e constante apoio na realização das minhas tarefas, sempre com um ambiente positivo caracterizado pelo espírito de equipa e boa disposição.

Referências Bibliográficas

BLUEPHARMA, Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>;
(Acedido a 10/09/2020)

PARTE II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Machado



Lista de Abreviaturas

FM – Farmácia Machado

IPO – Instituto Português de Oncologia

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

SARS-CoV-2 – Síndrome Respiratória Aguda Grave - Coronavírus 2

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*

Introdução

Durante o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), os estudantes vão adquirindo conhecimento teórico especializado em inúmeras áreas, tais como Bioquímica, Farmacologia, Farmacognosia, Farmacoterapia entre outras, sendo todas elas áreas de grande importância para a saúde.

Todo o conhecimento adquirido durante estes anos é muito importante pois, devido às amplas saídas profissionais que o curso oferece, os seus estudantes – futuros farmacêuticos – ganham as ferramentas necessárias para exercer a sua profissão com a maior excelência exigida.

Uma das principais áreas de trabalho de um farmacêutico centra-se na Farmácia Comunitária. Neste local, o farmacêutico, como agente da saúde pública, deverá ter a capacidade de promover um estilo de vida saudável, acompanhar/aconselhar os seus utentes ao nível da sua medicação (por exemplo, esclarecendo dúvidas quanto à toma de uma nova medicação, identificar incompatibilidades em polimedicação e explicando as contra-indicações), ser capaz de efetuar todos os serviços que estão ao dispor na sua farmácia (medição da glicémia, da tensão arterial, entre outros) e interpretar os seus resultados.

Um bom desempenho por parte de um farmacêutico numa Farmácia Comunitária é de extrema importância pois, nos dias de hoje, as farmácias são a primeira linha do Sistema Nacional de Saúde devido à proximidade e à confiança depositada nos farmacêuticos por parte da população e ao fácil acesso a estes locais, podendo assim ser evitada uma ida ao hospital, que comportaria despesas desnecessárias ao nível dos outros serviços de saúde.

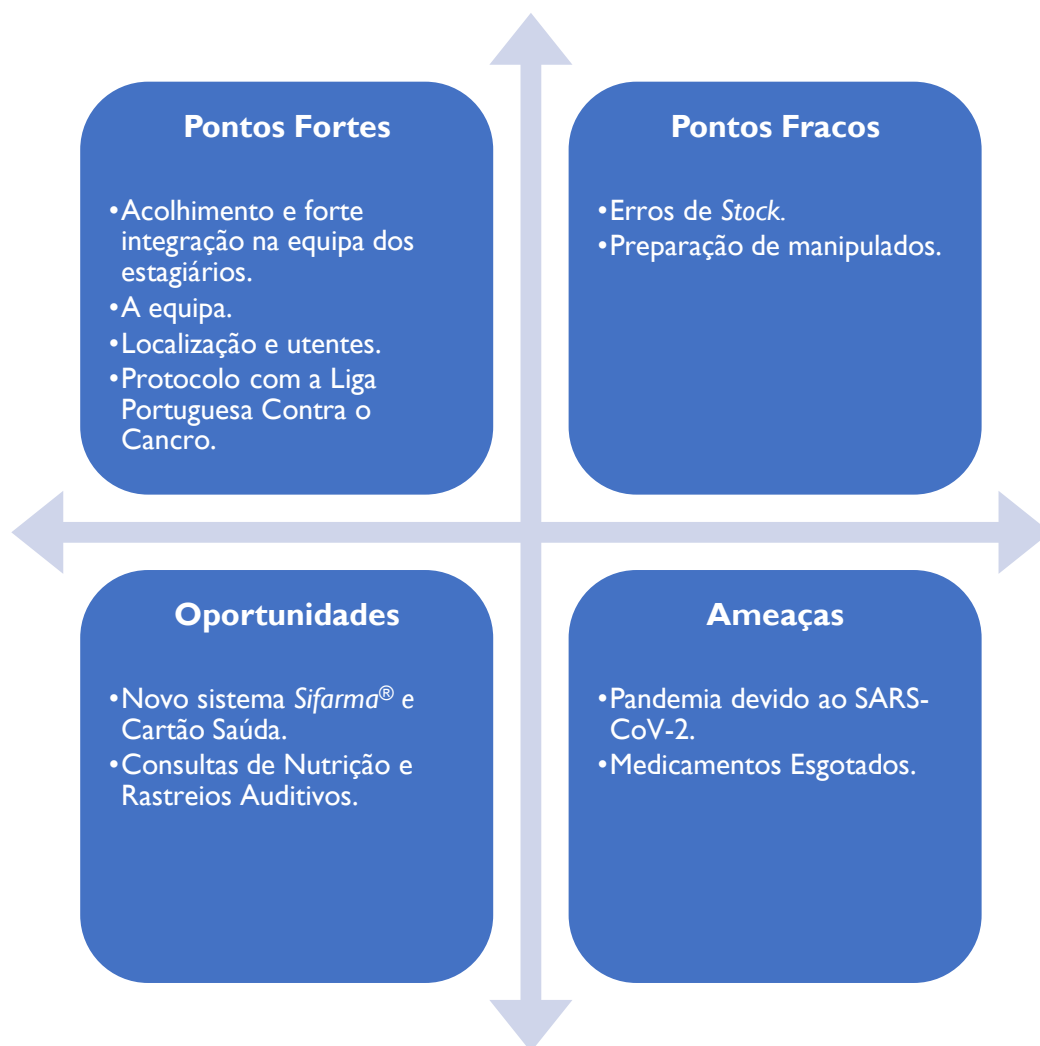
Assim, antes da conclusão do MICF, no último ano, o estudante tem no seu plano curricular o “Estágio Curricular” que lhe permite pôr em prática todo o conhecimento adquirido nos primeiros quatro anos e de forma ganhar experiência para, quando chegar a hora de entrar no mercado de trabalho, ter todas as capacidades e conhecimentos, quer teóricos quer práticos, para exercer a sua profissão com a maior qualidade e responsabilidade que a área da saúde exige.

Nesta fase final do meu percurso académico, tive a oportunidade de realizar o meu Estágio Curricular na Farmácia Machado (FM), que durou cerca de 4 meses, sob a orientação do Dr. João Manuel Baliza Santiago Maia, proprietário e diretor-técnico. Nesta fase, tive a oportunidade de pôr em prática todo o conhecimento teórico abarcado nos 5 anos. Este

estágio também me permitiu realizar atividades de teor organizacional, como a receção/realização de encomendas, verificação de stocks, manutenção de receituário, armazenamento dos medicamentos e, por fim, ter o primeiro contacto com o doente no atendimento ao balcão.

Análise SWOT

Com o intuito de fornecer uma perspetiva pessoal acerca do meu estágio irei apresentar uma análise *SWOT* (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities and Threats*) onde apresentarei os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças com os quais me deparei até ao término do meu estágio em Farmácia Comunitária, na Farmácia Machado.



Pontos Fortes (Strengths)

- **Acolhimento e forte integração na equipa dos estagiários**

Um dos pontos fulcrais no sucesso de qualquer estagiário acontece logo no início do seu estágio, onde a forma como é recebido e integrado na equipa influenciará todo o seu percurso durante o estágio. O fator que mais me impressionou foi a disponibilidade e espírito de ajuda da equipa da FM para com os estagiários desde o primeiro até ao último dia do meu estágio. Numa primeira instância, a equipa explicou o método de funcionamento das várias tarefas que poderíamos fazer, desde a receção de encomendas, verificação da validade e integridade da embalagem, confirmação de todos os valores nas faturas que acompanham as encomendas e o armazenamento dos medicamentos no local indicado. Posteriormente, após alguma aprendizagem visual, foi-nos transmitida a forma correta de atender ao balcão, começando os estagiários a exercer também esta tarefa, o que tornou possível a aprendizagem da utilização do sistema informático *Sifarma 2000*[®], programa de extrema importância para qualquer farmácia, e também do cartão Saúda. Todas estas tarefas que nos foram incumbidas, sempre com a supervisão necessária e a total disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas desde o primeiro momento em que contactamos com a equipa, demonstraram uma enorme confiança para com os estagiários tornando possível uma rápida integração na equipa, na farmácia e no “*modus operandi*” desta.

- **A equipa**

A equipa técnica da FM caracteriza-se pelo profissionalismo, consistência, simpatia, pela enorme capacidade quer no aconselhamento aos seus utentes, quer na realização dos serviços presentes na farmácia. Esta é constituída por 5 elementos – Dr. João Maia – diretor-técnico, Dra. Rita Garrett e Dra. Mariana Lopes – farmacêuticas adjuntas, Dr. João Teixeira-farmacêutico, Sr. Eduardo Cruz- técnico auxiliar, conseguindo conjugar o conhecimento dos seus membros mais experientes com o dinamismo dos mais jovens transmitindo, assim, uma imagem de credibilidade e segurança aos seus utentes. Todas estas características aliadas a um bom ambiente e a um exímio trabalho de equipa tornou todo o processo de aprendizagem mais fácil.

Aproveito para destacar, também, a capacidade de adaptação de todos os membros da equipa pois, devido à fase em que foi realizado o estágio (pandemia devido ao SARS-CoV-2), várias alterações ao modo do atendimento foram necessárias e toda a equipa foi capaz de se

manter atualizada e de cumprir todas as regras de segurança em prol do bem de toda a comunidade.

- **Localização e utentes**

A localização de uma farmácia é muito determinante para o seu sucesso. A FM encontra-se em Celas, na freguesia de Santo António dos Olivais. Estando localizada no centro de Coimbra, é uma mais-valia no que toca à diversidade de clientes e ao ambiente onde se insere. Para além de ser uma zona prioritária de residência para muitos estudantes, devido à proximidade de várias instituições de ensino, e para alguns trabalhadores devido à presença de várias superfícies comerciais, a FM também se localiza perto de várias instituições de saúde tais como a Maternidade Bissaya Barreto, o Centro de Saúde Familiar Cruz de Celas, o Instituto Português de Oncologia (IPO), os Hospitais da Universidade de Coimbra, o Hospital Pediátrico e também vários consultórios médicos privados. Todos estes locais proporcionam a ida de novos clientes à farmácia, clientes estes que integram todo o espectro de idades.

Por outro lado, sendo a FM uma farmácia com muitos anos de existência e de enorme qualidade, muitos dos seus utentes deslocam-se a esta farmácia não apenas pela proximidade, mas também pela confiança que têm nos seus profissionais de saúde, que os acompanharam durante toda a sua vida. Estes clientes são de extrema importância pois demonstram a segurança e o profissionalismo no acompanhamento da medicação e no aconselhamento à comunidade. A nível pessoal, a fidelização dos clientes também foi importante pois, a certa altura do estágio, já era capaz de reconhecer alguns dos utentes habituais da farmácia, o que ajudava na interação e facilitava o atendimento e o aconselhamento.

- **Protocolo com a Liga Portuguesa contra o Cancro**

Como referido anteriormente, a FM localiza-se perto do IPO, permitindo a celebração de um protocolo entre ambas as partes, que visa ajudar os doentes oncológicos com mais dificuldades económicas, assegurando o acesso aos medicamentos e aos tratamentos complementares aos realizados no Instituto para estes doentes. O protocolo consiste na dispensa dos medicamentos receitados pelo médico (que o doente precisa para continuar o seu tratamento) de forma gratuita. É de salientar que a participação da Liga Portuguesa Contra o Cancro, na dispensa destes medicamentos, pode ser integral ou apenas parcial.

O protocolo é posto em prática quando um utente se dirige à farmácia, dá a indicação que vem da parte da Liga ou do IPO e entrega ao farmacêutico a receita médica e um documento emitido pela Liga (assinado pelo assistente social), onde consta a quantidade de medicação a dispensar. Caso a receita seja para ser dispensada na totalidade, vem indicado neste documento algo como “É favor aviar na totalidade”. Se for apenas uma dispensa parcial, no documento consta uma informação distinta, como “Aviar 1 embalagem do medicamento X, 2 do medicamento Y e 1 do medicamento Z”. Estes dois documentos são guardados num processo juntamente com a fatura dos medicamentos (assinada pelo utente), para mais tarde (no final de cada mês), ser entregue à Liga de forma a ser tudo regularizado.

O utente leva a medicação indicada de maneira gratuita e a Liga regulariza o montante em crédito de todos os seus utentes que vão à farmácia no final de cada mês.

Sem dúvida que este protocolo foi um ponto forte no meu estágio pois permitiu-me ter contacto com doentes oncológicos que, devido à frequência do seu tratamento, tornavam-se clientes regulares na farmácia, conduzindo a um acompanhamento terapêutico mais aprofundado e facilitando o esclarecimento de qualquer dúvida em relação ao seu tratamento.

É importante referir que, durante o Estado de Emergência provocado pela pandemia do SARS-CoV-2, a Liga encontrou-se encerrada para serviço presencial aos seus utentes. Durante este período, para obter a sua medicação, os utentes apenas entregavam a receita médica; o documento da Liga era enviado para o *email* da farmácia após o contacto telefónico de um dos colaboradores da farmácia para a Liga, para mais tarde ser colocada no processo.

Pontos Fracos (Weaknesses)

- **Erros de Stock**

Quando chegava uma encomenda à farmácia, esta era prontamente recolhida por um colaborador que, na zona do *backoffice*, ficava encarregue de dar entrada desta encomenda no sistema informático *Sifarma 2000*[®]. Quando era dada a entrada, era acrescentado ao *stock* físico os medicamentos que vinham nessa encomenda, ficando assim o *stock* de medicamentos da farmácia atualizado. Por outro lado, quando num atendimento era aviado um medicamento, dava-se baixa no sistema informático *Sifarma 2000*[®]. Estas operações permitem uma manutenção atualizada do *stock* de medicamentos da farmácia.

No entanto, durante alguns dos meus atendimentos, verifiquei que os *stocks* não estavam corretos, havendo indicação de que certo medicamento estava disponível quando, de facto,

não era o caso. Esta falha pode ser atribuída a um erro de *stock* ou a algum arrumo indevido do medicamento. Na maioria dos casos esta situação ficava resolvida com a realização de encomendas instantâneas para os distribuidores com os quais a farmácia trabalha (principalmente a Plural e a Empifarma), permitindo, assim, a obtenção do medicamento em falta num curto espaço de tempo. Em alguns contextos, esta situação causava transtorno para certos utentes pois estes precisavam do medicamento na hora, tendo assim de se deslocar a outro local para o obter.

- **Preparação de manipulados**

A não preparação nem a observação da realização de algum tipo de manipulados no meu estágio, foi sem dúvida um dos pontos fracos. Isto deve-se ao facto de os medicamentos manipulados terem caído em desuso e a sua produção pelas indústrias farmacêuticas não ser apelativa monetariamente.

Tendo em conta a unidade curricular de “Farmácia Galénica”, que consiste na aprendizagem da preparação de manipulados, este tipo de conhecimento é indispensável para qualquer farmacêutico.

Oportunidades (*Opportunities*)

- **Novo Sistema *Sifarma*[®] e Cartão Saúde**

Apesar da grande maioria dos atendimentos durante o meu estágio ter sido realizada no sistema informático *Sifarma*[®] 2000, tive a oportunidade de aprender e trabalhar com o novo módulo de atendimento do *Sifarma*[®] desenvolvido pela Glintt. O novo módulo de atendimento é mais intuitivo pois, devido à sua interface mais moderna, torna o seu manuseamento mais fácil, perceptível e rápido, tornando assim o atendimento mais focado no doente.

Tal permitiu-me conhecer e adquirir experiência na utilização do novo módulo de atendimento, que já tem vindo a ser implementado em algumas farmácias e que brevemente será de uso obrigatório.

Um outro sistema informático com o qual tive a oportunidade de trabalhar foi o Cartão Saúde, visto que a FM integra as Farmácias Portuguesas e tem este serviço disponível. Isto permite aos seus utentes acumularem 1 ponto por cada euro gasto em produtos não sujeitos a receita médica ou em alguns serviços; caso seja a primeira compra do dia tem direito a 1

ponto extra numa compra superior a 3 euros. Este valor acumulado pode ser rebatido em produtos, serviços, e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) que estejam indicados no Catálogo de Pontos Saúde. Este cartão é, sem dúvida, uma mais-valia quer para a farmácia quer para o utente.

- **Consultas de nutrição e rastreios auditivos**

A FM tem semanalmente, inseridas no programa *EasySlim*[®], consultas de nutrição onde os utentes têm a oportunidade de ser acompanhados por uma nutricionista. Para complementar este serviço, a farmácia tem ao seu dispor vários suplementos alimentares da *EasySlim*[®] aos quais os utentes podem recorrer para a elaboração do seu plano nutricional.

Uma vez por mês são, também, realizados rastreios auditivos (com a marca Evollu) onde os utentes, de forma gratuita, podem efetuar um teste à sua saúde auditiva e, se houver interesse, posteriormente, podem marcar uma consulta auditiva mais especializada.

Ter este tipo de serviços numa farmácia é muito importante pois, para além de ser um agente do medicamento, um farmacêutico deve sempre procurar a promoção de um estilo de vida saudável.

Ameaças (*Threats*)

- **Pandemia devido ao SARS-CoV-2**

O início do meu estágio aconteceu dias após serem apresentadas as diretrizes anunciadas pela DGS para o regresso “à normalidade”, onde o número de casos de infeção e de mortes por SARS-CoV-2 já estaria a diminuir e já era seguro para os estudantes continuarem os seus estágios. No entanto, o receio ainda continuou na comunidade e as pessoas, como era expectável (e recomendado), apenas saíam de suas casas quando efetivamente precisavam, fazendo com que as idas a farmácias e outro tipo de serviços fossem diminuindo.

Novas medidas tiveram de ser adotadas nas farmácias como a utilização de acrílicos, máscaras e/ou viseiras, a implementação de um limite de pessoas dentro do espaço da farmácia, entre outros. Tudo isto, apesar de ser implementado para a própria segurança dos utentes e para nossa própria segurança, acabou por prejudicar alguns atendimentos pois aumentou a dificuldade que certos utentes tinham em ouvir, em expressar aquilo que estavam a sentir ou mesmo em explicar aquilo que precisavam. Se estas situações já eram difíceis para

um colaborador com alguma experiência, para um estagiário ainda se tornou mais complexo devido, por exemplo, à inexperiência com pessoas mais idosas ou mais debilitadas.

- **Medicamentos esgotados**

Em muitos dos atendimentos do meu estágio, vários utentes apenas vinham perguntar se tínhamos determinado medicamento, porque não conseguiam arranjar em nenhuma outra farmácia. Isto deve-se ao facto de vários medicamentos estarem esgotados há algum tempo no nosso país, quer devido à interrupção na produção deste fármaco por parte das indústrias farmacêuticas, mas também devido à exportação de medicamentos para entidades estrangeiras onde, normalmente, o retorno financeiro é mais elevado (denominado exportação paralela). Tal perfaz uma ameaça ao normal funcionamento de uma farmácia pois é uma falha causada por uma entidade externa que causa transtorno aos utentes. Para além disso, alguns dos medicamentos esgotados não têm alternativa/substituto no mercado, o que torna a tarefa dos colaboradores mais complicada quando é pedida uma solução por parte do utente.

Conclusão

O meu estágio em Farmácia Comunitária teve a duração de cerca de 4 meses e, durante todo este tempo, tive a oportunidade de trabalhar com pessoas dinâmicas, experientes e extremamente profissionais o que permitiu uma aprendizagem contínua e constante ao longo de todo o meu percurso na FM.

É um facto que a pandemia, que assolou toda a população, poderá ter afetado o estágio, mas, de uma maneira geral, consegui abarcar todo o conhecimento que me foi incutido e realizar todas as tarefas propostas.

Apesar de ter sido um estágio de 670 horas, foi suficiente para perceber a importância que o farmacêutico tem na comunidade em geral, devido ao facto de, na maioria das vezes, ser o primeiro ponto de contacto entre o doente e os serviços de saúde. O farmacêutico, como especialista do medicamento, tem a capacidade de esclarecer dúvidas aos seus utentes e aconselhar quanto a possíveis soluções para um problema sendo, assim, um pilar fundamental na prestação de serviços de saúde à comunidade. Após esta percepção e depois de ver todos os colaboradores da FM realizarem o seu trabalho de maneira exemplar, percebi que o farmacêutico não tem o reconhecimento merecido por parte da sociedade.

Durante o tempo que estagiei na FM, também percebi que as farmácias estão em constante evolução devido às contínuas atualizações das diretrizes indicadas pelo Sistema Nacional de Saúde e de novas legislações, o que faz com que esta área esteja em constante mudança e evolução.

Quero deixar uma palavra de agradecimento a todos os colaboradores da FM que, durante todo o meu estágio, tiveram disponibilidade total para explicar a forma de como se realizavam as tarefas e também para esclarecer as dúvidas que surgiram ao longo da execução das mesmas. Todo este percurso foi marcado pela simpatia e espírito de ajuda entre toda a equipa, tornando o meu estágio em Farmácia Comunitária uma etapa extremamente positiva, despertando ainda mais a minha curiosidade nesta área para o meu futuro profissional.

PARTE III

Monografia

“Impacto do nitrato e nitrito na saúde humana: um novo paradigma em evolução”

Lista de Abreviaturas

ADI – *Advised Daily Intake*

ADP – Difosfato de Adenosina

ATP – Trifosfato de Adenosina

CH₃N₂⁺ – Ião Metil Diazônio

DASH – *Dietary Approaches to Stop Hypertension*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

Fe²⁺ – Ferroso

Fe³⁺ – Férrico

GMPc – Monofosfato Cíclico de Guanosina

GTP – Trifosfato de Guanosina

HCO₃⁻ – Bicarbonato

HNO₂ – Ácido Nitroso

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

NDMA – N-nitrosodimetilamina

·NO – Radical Óxido Nítrico

·NO₂ – Radical Dióxido de Azoto

NO²⁻ – Nitrito

NO³⁻ – Nitrato

N₂O₃ – Trióxido de Dinitrogénio

NOS – Óxido Nítrico Sintetases

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONOO⁻ – Anião Peroxinitrito

PGAs – Produtos Finais de Glicosilação Avançada

PO₄³⁻ – Fosfato

TFG-β – Fator de Transformação de Crescimento Beta

VOP – Velocidade de Onda de Pulso

Abstract

The impact of nitrate in human health has been a matter of intense debate in recent years since new discoveries suggest that not only it may not have detrimental effects for human health but instead, may promote gastrointestinal, cardiovascular and brain function.

In an earlier phase, nitrate and nitrite were viewed as noxious agents, mostly because they were associated with two pathologies: 1) nitrite was associated to the appearance of methemoglobinemia in babies, due to the ingestion of water with high concentrations of nitrite and 2) nitrite was also associated to carcinogenic effects due to its role in the formation of nitrosamines (N-nitrosation of primary amines acquired in the diet).

Later on, the discovery of enterosalivary circulation and the various transformations that nitrate is put through in our organism (namely conversion to nitrite and nitric oxide) raised interest in various scientists about the physiological effects of these new compounds in human health. Therefore, a significant amount of studies were developed and new effects were attributed to nitrate, nitrite and their metabolites. These new studies unveiled protective effects at various levels in our body such as cardiovascular, gastrointestinal and cerebral effects.

Keywords: nitrate; nitrite; nitric oxide; human health; nitrosamines; carcinogenic effects; enterosalivary circulation; protective effects.

Resumo

A perspetiva acerca do impacto do nitrato na saúde humana tem vindo a sofrer várias alterações ao longo dos tempos, muito devido às sucessivas descobertas acerca das suas transformações *in vivo* e conseqüente procura pelos impactos que estas transformações têm no nosso organismo.

Numa fase inicial, o nitrito tinha uma imagem negativa na sociedade. Isto devia-se ao facto de este composto ser associado a algumas patologias aquando a sua ingestão (como por exemplo, na associação do surgimento da meta-hemoglobinémia em bebés devido ao consumo de águas com concentrações elevadas de nitrito) e, mais tarde, a associação a efeitos carcinogénicos devido à formação de nitrosaminas a partir do nitrito (através da N-nitrosação de amins primárias da dieta). Contudo, apesar destas associações e de vários estudos nesta área, não havia evidências concretas destes efeitos na saúde humana.

Mais tarde, a descoberta da circulação enterosalivar do nitrato e das várias conversões a que o nitrato é sujeito no organismo (nomeadamente conversão a nitrito e a óxido nítrico) suscitaram o interesse de vários cientistas acerca dos potenciais efeitos fisiológicos que estes compostos exercem na saúde humana. Assim, foram efetuados vários estudos e novos efeitos foram atribuídos ao nitrato e seus metabolitos. Estes estudos revelaram efeitos a protetores a nível gastrointestinal, cardíaco e inclusivamente cerebral.

Palavras-chave: nitrato; nitrito; óxido nítrico; saúde humana; nitrosaminas; efeitos carcinogénicos; circulação enterosalivar; efeitos protetores.

I. Introdução

Desde a descoberta do possível impacto biológico do nitrato, os efeitos do seu consumo no organismo humano têm gerado um grande número de estudos e as suas conclusões têm vindo a influenciar de uma maneira expressiva várias atividades na nossa sociedade, desde a regulamentação da concentração de nitrato presente na água, até ao modo e meios de cultivo utilizados na agricultura bem como à forma de armazenamento das colheitas (Weitzberg e Lundberg, 2013).

Nos anos 70 e 80, vários estudos relataram um papel carcinogénico do nitrato inorgânico devido à sua conversão em compostos N-nitrosados (Green *et al.*, 1981; Tannenbaum *et al.*, 1974) com consequente dano no ácido desoxirribonucleico (DNA). Por exemplo, nitrosaminas formadas a partir da reação de amins primárias com o anião peroxinitrito (ONOO^-), resultado da reação do óxido nítrico (NO) com o radical superóxido, podem levar à modificação de bases no DNA, afetando as propriedades de emparelhamento e até mesmo à quebra de cadeias, originando mutações no DNA (Islam *et al.*, 2015).

Assim, o consumo de nitrato começou a ser considerado uma prática potencialmente perigosa para a saúde humana fazendo com que fossem criados vários limites em relação ao seu consumo. Sabendo que as principais fontes de nitrato são os produtos vegetais, a quantidade de nitrato presente neste tipo de alimentos e na sua produção passou a ser regulada de forma a controlar a dose máxima de consumo diário. Também foram impostas regulações mais apertadas na concentração de nitrito na água, devido à sua associação a certas patologias (Bryan e Grinsven, van, 2013; Gilchrist, Winyard e Benjamin, 2010). Anos mais tarde, o interesse no papel biológico do nitrato voltou a ganhar atenção de vários cientistas quando se descobriu que este poderia ser convertido a nitrito e NO no organismo.

Estudos da década de 90 demonstraram que o nitrato pode ser reduzido a nitrito endogenamente (Lundberg, Weitzberg e Gladwin, 2008). Após a ingestão, o nitrato atinge a circulação sanguínea depois de ser absorvido no intestino delgado. Posteriormente, na circulação sanguínea passa a haver circulação de nitrato proveniente da dieta e do nitrato resultante da oxidação do NO produzido pelas óxido nítrico sintetases (NOS). A maior parte do nitrato circulante no sangue é excretado pelos rins, mas cerca de 25% chega às glândulas salivares e aqui é secretado juntamente com a saliva. Na cavidade oral existem bactérias anaeróbias facultativas capazes de reduzir parte do nitrato a nitrito. Após esta conversão, o

nitrito presente na saliva que é engolida atinge o ácido do estômago onde é protonado a ácido nitroso, gerando NO e outros óxidos de azoto (Lundberg, Weitzberg e Gladwin, 2008).

2. A origem do nitrato no organismo humano

O nitrato está presente no meio ambiente sobretudo devido ao seu papel no ciclo do azoto, ciclo este de grande importância para a vida na Terra, pois é este ciclo que determina a quantidade de azoto presente no solo e é onde as plantas obtêm o azoto necessário para o seu desenvolvimento. A formação do nitrato deve-se à fixação do azoto atmosférico por algumas bactérias, tais como *Anabaena* e *Rhizobium*. O azoto, apesar de ser o composto em maior quantidade na atmosfera, não teria valor biológico algum não fosse a sua conversão em amónio realizada por algumas bactérias que fixam o azoto com hidrogénio. Após esta conversão, o amónio (composto tóxico) sofre o processo de nitrificação onde é oxidado originando nitrito e subsequentemente nitrato. Por fim, ocorre a desnitrificação onde o nitrato é sucessivamente reduzido a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso e novamente a azoto que finalmente se volta a difundir para a atmosfera (Stein e Klotz, 2016; Weitzberg e Lundberg, 2013).

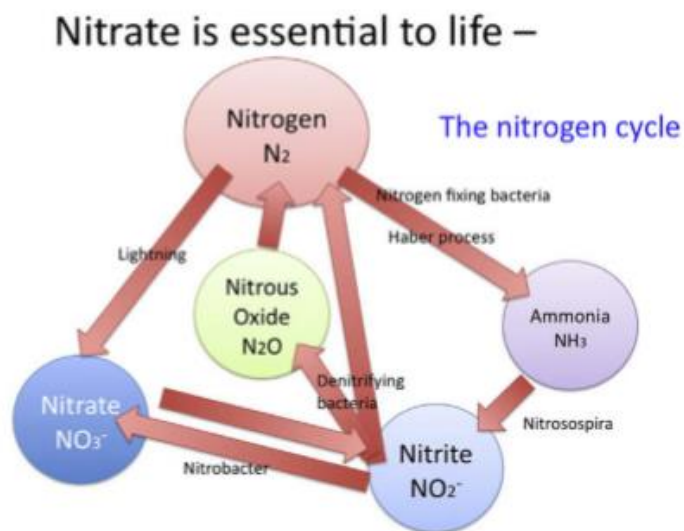


Figura 1. O ciclo do azoto, composto essencial para a vida. (Reproduzido de Gilchrist M, Winyard PG, Benjamin N. Dietary nitrate--good or bad?. Nitric Oxide. 2010;22(2):104-109).

No organismo humano, cerca de 80% do nitrato obtido é fornecido através da dieta. O consumo de vegetais tais como espinafres, alface e brócolos (vegetais com folhas verdes normalmente têm uma maior quantidade de nitrato) fornece aproximadamente 60% a 80% do nitrato circulante. O consumo de água também contribui para uma ingestão significativa de nitrato (15% a 20%) e, em menor proporção, as carnes curadas podem também contribuir para a ingestão de uma pequena percentagem deste anião (10% a 15%). Os restantes 20% do nitrato é produzido *in vivo* por oxidação do NO (Ma *et al.*, 2018).

A acumulação de nitrato nos produtos consumidos pode depender do alimento em si e de vários outros fatores como as condições do solo (presença de fertilizantes), condições de crescimento (variabilidade de luz) e condições de armazenamento e transporte. Por exemplo, num mercado na cidade de Deli na Índia, os níveis de nitrato em 3 amostras de espinafre variaram de 71 a 429,3 mg/100g (Hord, Tang e Bryan, 2009).

Como será explanado no capítulo seguinte, o consumo de nitrato foi considerado nocivo para a saúde humana durante décadas, estando sobretudo associado ao desenvolvimento de cancro e meta-hemoglobinémia (Fewtrell, 2004). Assim, várias restrições foram impostas não só aos agricultores relativamente ao modo de cultivo e armazenamento (restrições no uso de fertilizantes, controlo da luminosidade) dos seus produtos, mas também a nível da água potável, onde foram estabelecidos limites máximos da concentração de nitrato, com o intuito de se controlar a dose diária deste anião. Como exemplo, na Europa o limite máximo da concentração de nitrato é de 50 mg nitrato/L enquanto que nos Estados Unidos da América é de 44 mg nitrato/L. (Gilchrist, Winyard e Benjamin, 2010).

O consumo médio de nitrato é de cerca de 40-100 mg/dia nos Estados Unidos e 50-180 mg/dia na Europa, havendo um maior consumo nos países banhados pelo Mediterrâneo em comparação com o Norte da Europa. Isto poderá ser devido à dieta mediterrânea ser mais rica em vegetais e produtos com maior concentração de nitrato. Contudo, deve-se salientar que o consumo de nitrato difere de pessoa para pessoa, entre países e até entre regiões (Weitzberg e Lundberg, 2013).

A título de exemplo, comparando a percentagem de consumo de nitrato e nitrito entre o Reino Unido e a França, verifica-se que existem diferenças na quantidade ingerida destes compostos para o mesmo tipo de dieta. Isto poderá ser devido ao facto de, como referido anteriormente, o mesmo alimento ter diferentes concentrações destes aniões.

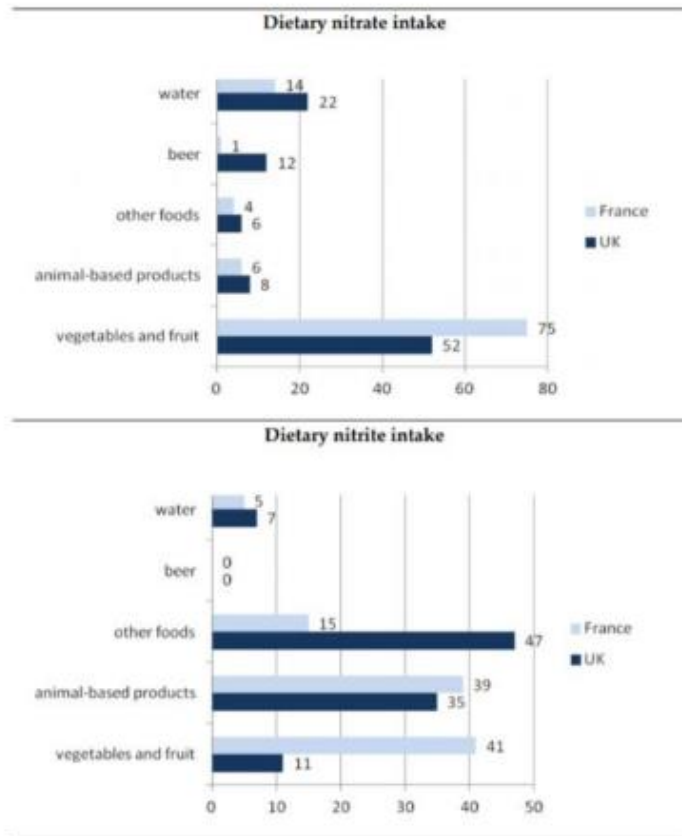


Figura 2. Percentagem de consumo geral diário de nitrato e nitrito. (Reproduzido de Karwowska M, Koniuk A. Nitrates/Nitrites in Food-Risk for Nitrosative Stress and Benefits. *Antioxidants* (Basel). 2020;9(3):241. Published 2020 Mar 16. doi:10.3390/antiox9030241).

No entanto, é necessário ter em consideração que parte do nitrato da dieta é convertido *in vivo* a nitrito por ação do microbiota oral. Com efeito, a maior parte do nitrito (80-85%) *in vivo*, é originado a partir da redução endógena do nitrato. Assim estes valores irão depender da eficácia desta conversão, isto é, da abundância de bactérias redutoras de nitrato na cavidade oral, e não apenas na quantidade ingerida destes compostos.

3. Riscos do consumo de nitrato para a saúde humana

Os primeiros receios acerca do consumo de nitrato surgiram nos anos 40 quando vários casos de meta-hemoglobinemia foram associados a águas provenientes de um poço onde foram detetadas altas concentrações deste anião (Gilchrist, Winyard e Benjamin, 2010). A meta-hemoglobinemia é uma condição clínica caracterizada por uma concentração elevada de meta-hemoglobina no sangue. A meta-hemoglobina é formada quando o nitrito (neste contexto nitrito formado pela conversão do nitrato presente na água dos poços a nitrito pelas

bactérias anaeróbias presentes na cavidade oral) oxida o ferro do grupo heme da hemoglobina (Fe^{2+}) ao estado Fe^{3+} (forma férrica). Ao contrário do Fe^{2+} , o Fe^{3+} da meta-hemoglobina não se liga ao oxigénio, podendo levar a condições de anemia funcional e de hipoxia tecidual (Fewtrell, 2004).

Esta observação, apesar da índole fenomenológica, esteve na origem das restrições às concentrações de nitrato aceitáveis na água. Atualmente, vários países despendem milhões de euros para o tratamento das águas com o intuito de baixar os níveis de nitrato de forma a evitar casos de meta-hemoglobinemia (Gilchrist, Winyard e Benjamin, 2010).

No entanto, estudos mais recentes acerca da exposição ao nitrato em crianças e adultos, onde foram administradas diferentes quantidades de nitrato, mostram que mesmo as doses mais elevadas deste anião não induzem o aumento sérico de meta-hemoglobina em nenhum dos grupos etários. Assim, estes resultados sugerem que o consumo de nitrato por si só não poderá ser a causa desta patologia (Ward *et al.*, 2005).

Desde então muito se tem discutido acerca da associação entre o nitrato e a meta-hemoglobinemia, pois na altura o que aparentava ser uma hipótese plausível foi tomada como uma certeza absoluta apesar da falta de evidências.

Um alarme mais significativo relativamente ao consumo de nitrato surgiu nos anos 50 quando este anião foi associado à formação de N-nitrosaminas. Quase em simultâneo foi demonstrado que, ao reagirem com os ácidos nucleicos, as N-nitrosaminas podiam causar tumores hepáticos em animais (Magee e Barnes, 1956). Mais concretamente, foi reportado que a N-nitrosodimetilamina (NDMA) causava tumores no fígado de ratos. Isto deve-se ao facto da NDMA ser uma N-nitrosamina simétrica em que a hidroxilação de qualquer um dos seus hidrogénios irá formar o agente metilante alfa-hidroxi NDMA. Este agente é oxidado pelo Citocromo P-450 sendo convertido num agente carcinogénico, nomeadamente o ião metil diazónio (CH_3N_2^+) (Chikan *et al.*, 2012). Contudo, este ião é demasiado reativo para influenciar o funcionamento de outros órgãos a não ser os quais onde é formado e, por conseguinte, o seu efeito carcinogénico é limitado ao órgão onde é produzido.

Estes resultados desencadearam mais estudos onde foram descobertos vários compostos capazes de induzir directa ou indirectamente N-nitrosação, tais como o radical dióxido de azoto ($\cdot\text{NO}_2$) e ONOO^- (Karwowska e Kononiuk, 2020).

Assim, após se descobrir que o nitrato sofria conversão a nitrito *in vivo* através da circulação enterosalivar, um mecanismo que será descrito detalhadamente neste documento,

e que o nitrito poderia estar envolvido na formação de N-nitrosaminas no estômago através da N-nitrosação de amins provenientes da dieta, ambos os compostos passaram a ser associados a várias formas de cancro no Homem, principalmente o cancro gástrico. Após a conversão oral do nitrato a nitrito, quando o último atinge o estômago é protonado a ácido nitroso (HNO_2) devido ao pH ácido do suco gástrico. Por sua vez, dependendo das condições do meio (pH e local) e do conteúdo gástrico (tipo de dieta), o HNO_2 é decomposto em diferentes óxidos de azoto. Em jejum, em condições normais, o HNO_2 gera $\cdot\text{NO}$ e $\cdot\text{NO}_2$ que, através de reações de oxidação e nitração de proteínas e lípidos podem produzir moléculas fisiologicamente ativas (Weitzberg e Lundberg, 2013).

No entanto, o $\cdot\text{NO}$ e o $\cdot\text{NO}_2$ também poderão formar trióxido de dinitrogénio (N_2O_3) que reage com as amins através da de uma reação que é favorecida em pH ácido (ácido clorídrico do estômago) e na presença dos iões bicarbonato (HCO_3^-) e fosfato (PO_4^{3-}). Este mecanismo está na origem da formação das N-nitrosaminas, que estão associadas a efeitos carcinogénicos (revisto em Pereira *et al.*, 2013).

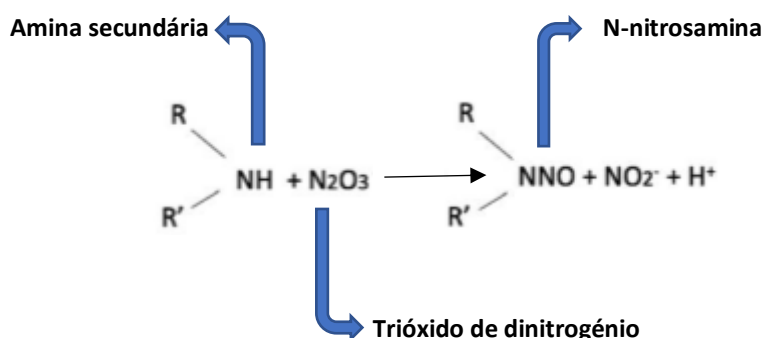


Figura 3. Formação de N-nitrosamina através da reação entre o trióxido de dinitrogénio (N_2O_3) com uma amina secundária.

Tendo em conta que a maior parte do $\cdot\text{NO}$ é produzido na junção esófago-gástrica, este mecanismo pode explicar a alta incidência de cancro nesta zona em pessoas com doença de refluxo gastroesofágico (Weitzberg e Lundberg, 2013).

Além disso, outras espécies derivadas do $\cdot\text{NO}$, como por exemplo o ONOO^- , originado pela reação do $\cdot\text{NO}$ com o radical superóxido, podem causar mutações no DNA, inibição dos sistemas de reparação do DNA e outros efeitos negativos a nível celular, despoletando mecanismos oncogénicos (Islam *et al.*, 2015). Adicionalmente, além da formação de compostos

carcinogénicos, o NO também estimula a circulação sanguínea em tumores, mecanismo associado ao seu crescimento (Weitzberg e Lundberg, 2013). Apesar de todos estes estudos, não há certezas acerca do papel carcinogénico do nitrato. Por outro lado, a produção de NO a partir do nitrato da dieta tem efeitos fisiológicos importantes não só ao nível do trato gastrointestinal, como também sistémicos. Estes efeitos, e os mecanismos moleculares associados, serão discutidos no Capítulo 5.

Em suma, numa análise recente, realizada em 2006, feita pela *Agency for Research on Cancer* foi concluído que “Existem evidências inadequadas em animais experimentais para a carcinogenicidade do nitrato; existe evidência suficiente em animais experimentais para a carcinogenicidade do nitrito em combinação com aminas ou amidas e há evidência limitada em animais experimentais para a carcinogenicidade do nitrito em si”. No mesmo ano a mesma agência também concluiu que existem evidências inadequadas em humanos para a carcinogenicidade do nitrato em alimentos e água potável (IARC, 2010).

4. A evolução de um novo paradigma: via do Nitrato-Nitrito-Óxido nítrico

A associação do nitrato à carcinogénese humana continua vigente na generalidade da comunidade científica e civil. Por este motivo, o seu consumo é altamente controlado através da imposição de limites máximos à sua concentração na maioria dos alimentos e na água. Contudo, não deixa de ser curioso que a principal fonte de nitrato no organismo humano é a dieta, sobretudo através do consumo de vegetais de folha verde. Estando estes alimentos associados a uma dieta saudável, recomendada inclusivamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sob a forma da dieta *Dietary Approaches to Stop Hypertension* (DASH) que, ao ser cumprida, implica uma ingestão diária de nitrato muito superior à dose máxima recomendada, serão de esperar efeitos salutares do consumo deste anião.

Num estudo realizado por Larsson e colegas em que foi avaliado o consumo de nitrito e nitrato em crianças dos 4 aos 12 anos de nacionalidade sueca, os autores concluíram que o consumo médio de nitrito derivado da ingestão de carnes curadas era de 0,007-0,13 mg/kg de peso corporal enquanto que o consumo de nitrato derivado de vários alimentos tais como vegetais, fruta, carnes curadas e água era de 0,45 a 0,84 mg/kg de peso corporal. Assim, estes valores não ultrapassam o *Acceptable Daily Intake* (ADI). No entanto, se for considerado o consumo total de nitrato, nomeadamente 5% do nitrato ser convertido a nitrito

endogenamente, 12% das crianças apresentam valores de nitrito que já ultrapassam o limite ADI (Larsson *et al.*, 2011).

Estudos iniciados na década de 90 demonstraram que o nitrato da dieta é reduzido a nitrito e NO *in vivo*, desencadeando respostas fisiológicas que vão desde o sistema gastrointestinal ao cardiovascular.

Tendo em conta que o nitrato presente no sangue e nos tecidos tem origem em duas fontes distintas – a oxidação do NO produzido endogenamente e a dieta – os níveis de nitrato irão depender do tipo de dieta de cada indivíduo e da síntese endógena de NO através da NOS.

Após ingestão de alimentos ricos em nitrato, este é rápida e eficientemente absorvido pelo intestino delgado. Cerca de 75% do nitrato consumido é excretado através da urina, mas uma parte é reabsorvido nos rins, sugerindo que o nitrato terá um papel relevante no organismo.

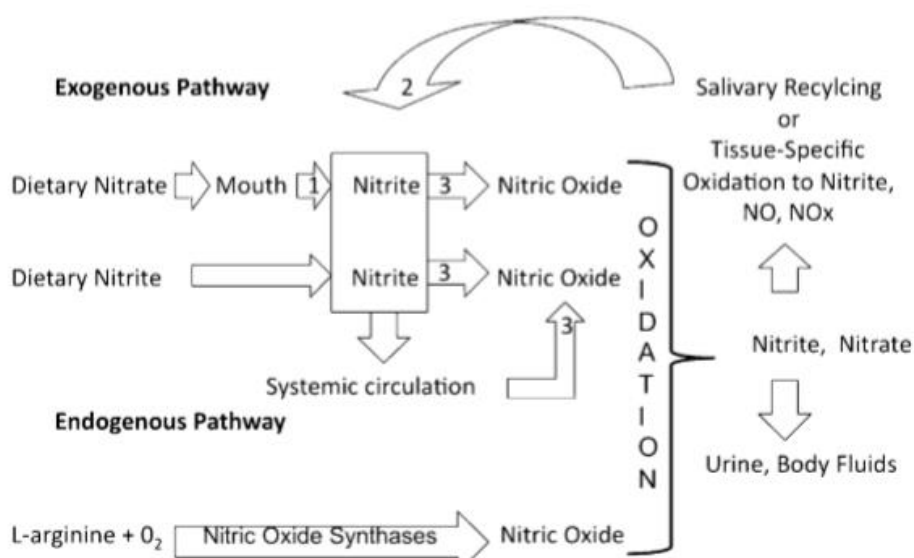


Figura 4. Mecanismo da via Nitrato-Nitrito- Óxido nítrico (Reproduzido de Hord, Norman & Tang, Yaoping & Bryan, Nathan. (2009). Food sources of nitrates and nitrites: the physiologic context for potential health benefits 1-3. The American journal of clinical nutrition. 90. 1-10).

Cerca de 25% do nitrato em circulação é transportado pela sialina nas glândulas salivares, misturado com a saliva e libertado na cavidade oral (Ma *et al.*, 2018) onde é reduzido a nitrito pela microflora presente nesta zona. Assim, é estabelecido o ciclo enterosalivar do nitrato, um mecanismo responsável pela recuperação biológica do nitrato (Koch *et al.*, 2017). Com

efeito, estudos nos quais foi feita uma avagem bucal antibacteriana com consequente redução dos efeitos biológicos do nitrato, robustecem a relevância do microbiota oral na biologia do nitrato (Govoni *et al.*, 2008). Apesar de algum nitrito salivar ser reduzido a NO no estômago, a maioria é absorvida sistemicamente, onde várias enzimas presentes no sangue nos tecidos catalisam a reação de redução a NO .

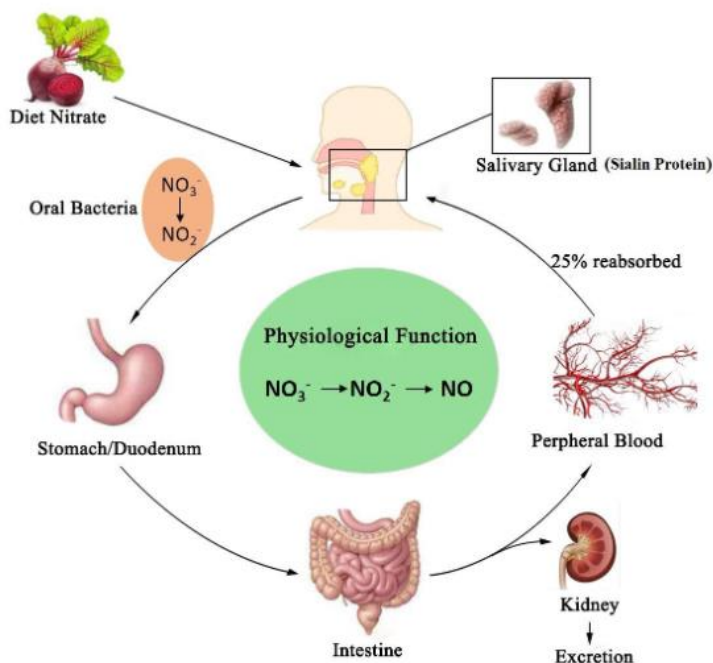


Figura 5. Circulação enterosalivar no nosso corpo. (Reproduzido de Ma L, Hu L, Feng X, Wang S. Nitrate and Nitrite in Health and Disease. *Aging Dis.* 2018;9(5):938-945. Published 2018 Oct 1).

Existem dois fatores em comum nos mecanismos de redução do NO : são favorecidos em ambientes de hipóxia e de baixo pH. Isto contrasta com a síntese endógena de NO dependente da NOS que requer oxigênio molecular, para além do substrato L-arginina e outros co-fatores (Förstermann e Sessa, 2012). Esta é, pois, uma via não enzimática de produção de NO *in vivo*. Curiosamente, o nitrato obtido através da alimentação é, grosso modo, biologicamente inerte. Apenas depois de ser reduzido a nitrito é que terá atividade biológica. Deste modo, o nitrato, servirá como fonte de nitrito, NO e outros óxidos de azoto.

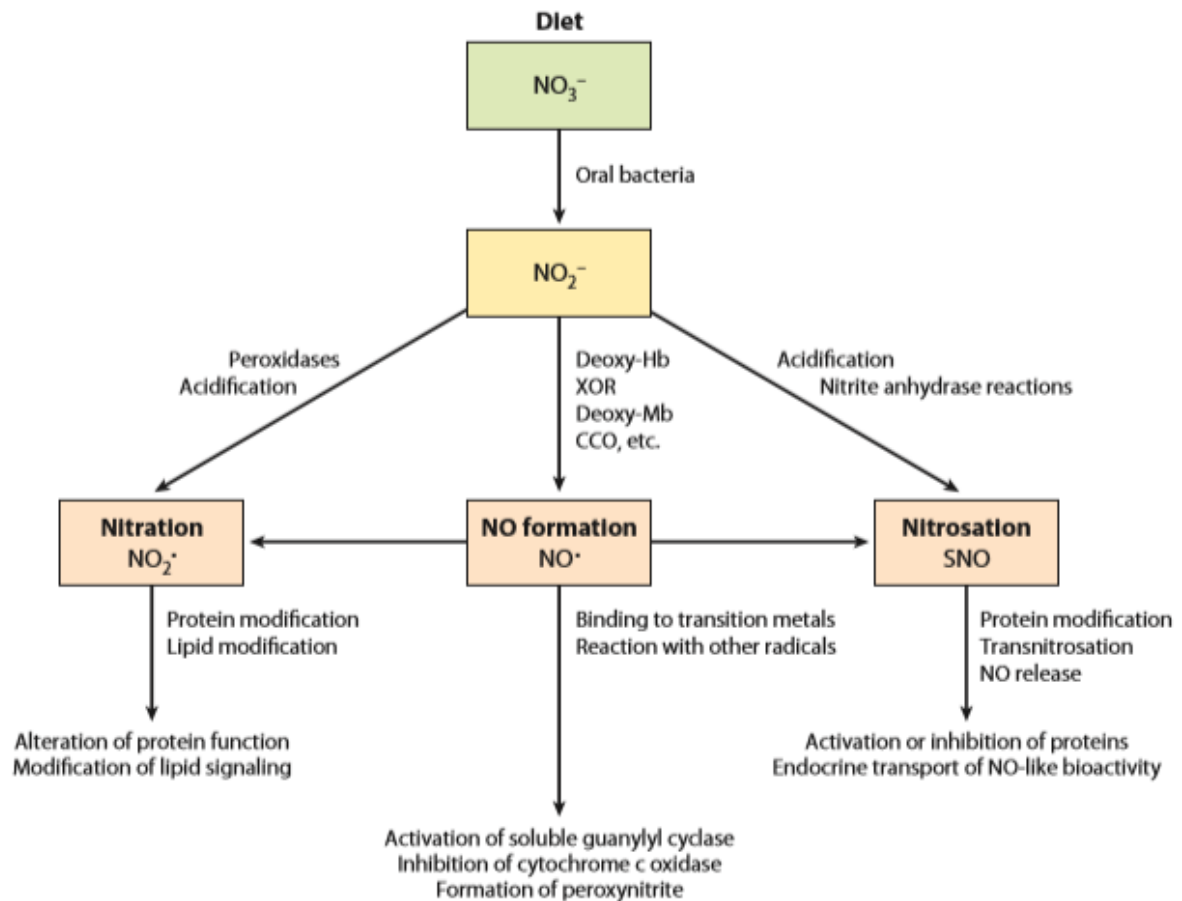
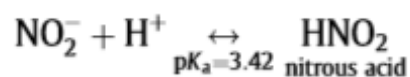
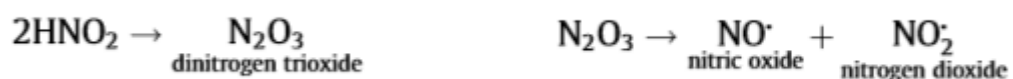


Figura 6. Transformações metabólicas do nitrito obtido através da dieta. (Reproduzido de Weitzberg E, Lundberg JO. Novel aspects of dietary nitrate and human health. *Annu Rev Nutr.* 2013;33:129-159).

Assim, após o nitrato ser convertido a nitrito na cavidade oral, este é deglutido juntamente com a saliva e, no estômago, é reduzido quimicamente a NO e outros óxidos de azoto. Quando o nitrito atinge o ácido no estômago é rapidamente protonado originando HNO_2 .



Tal como já mencionado, o HNO_2 irá decompor-se espontaneamente e irá originar NO e outros óxidos de azoto.



A nitroação pode ocorrer no lúmen intestinal ou na mucosa gástrica e normalmente entre os seus alvos estão as amins secundárias (**N-nitroação** que está associada a efeitos carcinogénicos), grupos tiol (**S-nitroação**, reação associada à bioatividade do $\cdot\text{NO}$ e à formação de compostos associados ao controlo da função proteica, nomeadamente funcionando como modificadores pós-tradução análogos à fosforilação das proteínas) e grupos fenol (**O-nitroação** que irá originar nitrato de etilo que é associado a vasodilatação).

É de notar que a reação de S-nitroação é mais favorecida cineticamente que a de N-nitroação (Weitzberg e Lundberg, 2013). Este é, na verdade, um dos mecanismos que poderá explicar o motivo pelo qual o nitrito derivado no nitrato não desencadeia N-nitroação *in vivo* e, portanto, não se verificam efeitos carcinogénicos.

Outro produto formado no ácido do estômago é o $\cdot\text{NO}_2$, o qual pode desencadear reações de nitração, o que normalmente é visto como algo prejudicial para a saúde (Lundberg, Carlström e Weitzberg, 2018).

Contudo, num estudo realizado por Rocha e seus colegas, foi descrito que a nitração da pepsina (enzima digestiva presente na mucosa gástrica que tem a função de clivar proteínas em peptídeos mais simples) poderia inibir a sua capacidade proteolítica havendo assim uma poupança da mucosa gástrica que, deste modo, permanece íntegra e menos vulnerável à erosão e ulceração (Rocha *et al.*, 2013).

Como outro exemplo temos a formação de nitroalcenos (produzidos através da nitração de ácidos gordos insaturados) que são compostos eletrofílicos com função anti-inflamatória (Schopfer *et al.*, 2005).

O $\cdot\text{NO}$, sendo um radical livre, exerce a sua função biológica interagindo com outros radicais ou com metais de transição, principalmente o ferro. Exemplo disto é a sua rápida ligação ao grupo heme (Fe^{2+}) de algumas proteínas. Esta alta afinidade para o heme também explica o reduzido tempo de semi-vida do $\cdot\text{NO}$ (segundos), sobretudo no sangue, quando sofre a reação de oxidação com a hemoglobina, sendo convertido a nitrato (Weitzberg e Lundberg, 2013). Com o surgimento deste novo paradigma, a via do nitrato-nitrito-óxido nítrico, um metabolito que era visto como um produto final da oxidação do $\cdot\text{NO}$, passou a ser um “reservatório” deste radical livre, pois mediante as condições químicas já mencionadas, o nitrato é reduzido a nitrito e $\cdot\text{NO}$ através de uma série de reações não enzimáticas (Lundberg, Weitzberg e Gladwin, 2008). Com efeito, parte do nitrito gástrico passa com o quimo para o intestino e aí é absorvido para a circulação sistémica. Vários órgãos e tecidos possuem proteínas e enzimas, tais como a hemoglobina/mioglobina desoxigenada e a xantina

oxidoreductase, capazes de reduzir o nitrito a NO (sobretudo em condições de hipoxia.) (Lundberg, Carlström e Weitzberg, 2018).

Este último é sobejamente conhecido pelas suas propriedades vasodilatadoras, daí a sua aplicação clínica no tratamento da angina pectoris e na disfunção erétil, mas é também um neuromodulador e agente antimicrobiano fundamental à resposta imunitária (Džoljić, Grabatinić e Kostić, 2015; Schopfer *et al.*, 2005).

5. Efeitos fisiológicos do nitrato da dieta: potenciais aplicações terapêuticas

O facto de o nitrato sofrer a conversão para NO será muito provavelmente a razão para este ter um impacto benéfico na nossa saúde, uma vez que o NO participa em vários mecanismos fisiológicos (Lundberg, Weitzberg e Gladwin, 2008).

Estudos evidenciaram que murganhos *knock out* (que não expressavam a NOS) desenvolveram hipertensão e disfunção metabólica pois apresentavam aumento de gordura abdominal e dislipidemia (Gehr, 2004; Huang *et al.*, 1995). Outros estudos relataram que tratamentos de longa duração com inibidores da NOS provocavam disfunções metabólicas (Balon *et al.*, 1999).

O mecanismo subjacente a efeitos fisiológicos, tais como a vasodilatação, deve-se à interação do NO com a guanilato-ciclase solúvel (Koch *et al.*, 2017; Moro *et al.*, 1996) e para além destes observam-se efeitos na agregação plaquetar devido à ligação a elementos sensíveis como o ferro, poderá afetar a transcrição de genes e a tradução do mRNA e, através da ribosilação do ADP, induzir modificações pós-tradução em proteínas (Moro *et al.*, 1996).

5.1- Sistema digestivo

5.1.1- Estômago

Tem-se demonstrado que as elevadas concentrações de NO produzidas no lúmen gástrico (o baixo pH deste meio favorece a redução do nitrito que advém da saliva) pode atuar como defensor contra agentes patogénicos ingeridos. Quando expostos a um pH baixo, vários agentes patogénicos (*Candida albicans*, *Escherichia coli* entre outros) acabam por sobreviver ao ácido clorídrico do estômago. No entanto, Benjamin e a sua equipa demonstraram, em 1994, que estes agentes patogénicos, quando expostos a uma mistura de ácido e nitrito de sódio

(reproduzindo a mistura de nitrito da saliva e o ácido gástrico), eram incapazes de sobreviver (Benjamin *et al.*, 1994). Em 2006, a mesma observação foi demonstrada por Björne e os seus colegas que utilizaram saliva e ácido gástrico humano, obtendo resultados semelhantes (Björne, Weitzberg e Lundberg, 2006).

Assim, a acidificação do nitrito obtido do nitrato da dieta parece ter um papel de destaque no combate contra agentes patogénicos ingeridos (Dykhuizen *et al.*, 1999).

5.1.2 - Cavidade oral

Tendo em conta que a cavidade bucal é onde ocorre o primeiro passo da conversão do nitrato a nitrito, também será neste local que ele poderá exercer a sua primeira ação protetora. A presença de altas concentrações de nitrato na saliva, adquiridas através da dieta, está associada à diminuição do aparecimento de cáries devido à inibição do crescimento de bactérias cariogénicas. Num estudo realizado por Barbara Hohensinn e seus colegas foi concluído que, após a ingestão de um sumo de beterraba (rico em nitrato) durante duas semanas consecutivas, o microbioma oral era alterado. A elevada concentração de nitrato irá aumentar a bioconversão de NO^3 a NO^2 e a subsequente acidificação do NO^2 provoca um aumento do pH na cavidade oral que levará à diminuição da presença de bactérias cariogénicas em que a sua função é beneficiada em ambientes ácidos. É importante referir que o impacto negativo do elevado grau de açúcar, normalmente um composto utilizado pelas bactérias, no sumo de beterraba é ultrapassado pelos efeitos da bioconversão do NO^3 a NO^2 (Hohensinn *et al.*, 2016).

5.2 - Sistema cardiovascular

5.2.1 - Pressão arterial

É sabido que uma dieta rica em frutas e vegetais tem um efeito anti-hipertensor, entre outros efeitos benéficos, sendo que este efeito poderá dever-se à grande quantidade de nitrato presente neste tipo de alimentos. Lundberg *et al.* e Weitzberg *et al.* (2013) demonstraram a diminuição da pressão arterial após suplementação com nitrito de sódio durante 3 dias (Weitzberg e Lundberg, 2013). O efeito máximo na redução da pressão arterial coincidiu com o pico de nitrito no plasma, de 380 μmol uma hora e meia após a ingestão. (Webb *et al.*, 2010) Se os participantes evitassem engolir a saliva, o efeito redutor da pressão arterial era abolido (Webb *et al.*, 2010). Esta evidência corroborou os resultados de Lundberg e Govoni que

observaram que quando voluntários humanos evitam engolir a saliva após a ingestão de nitrato, não se verifica um pico da concentração plasmática de nitrito, o que sugere que a redução bacteriana do nitrato a nitrito (e a sua subsequente redução gástrica e sistémica a NO) é necessária para a sua atividade biológica (Lundberg e Govoni, 2004). Além disso, resultados semelhantes foram obtidos ao fazer uma lavagem bucal com uma solução antibacteriana (ou antisséptica, com clorexidina) em animais (Kapil *et al.*, 2010; Weitzberg & Lundberg, 2013; Govoni *et al.*, 2013).

O mecanismo mais provável relativo ao efeito anti-hipertensor do nitrato assenta na sua redução a nitrito pela flora bacteriana da boca sendo, uma vez absorvido para a circulação sistémica, convertido a NO . O efeito vasodilatador deste radical livre será assim fundamental para a redução da pressão arterial.

5.2.2 - Função endotelial

O NO tem um papel fulcral na manutenção da função endotelial através das suas propriedades vasodilatadoras, antiagregantes e anti-adesivas (Webb *et al.*, 2010).

Num estudo realizado por Heiss e a sua equipa, foi demonstrado que a dilatação mediada por fluxo (dilatação de uma artéria quando o fluxo sanguíneo aumenta nessa artéria) em indivíduos saudáveis foi melhorada após administração de nitrato de sódio enquanto que a resposta intravenosa à nitroglicerina permaneceu inalterada (Heiss *et al.*, 2012).

Webb e os seus colegas também concluíram que, através de um estudo acerca da lesão endotelial devido a isquémia-reperfusão, a dilatação mediada por fluxo foi reduzida em 60% no grupo de controlo enquanto que no grupo que ingeriu 500 ml de sumo de beterraba (alimento rico em nitrato) a dilatação mediada por fluxo não sofria qualquer redução (Webb *et al.*, 2010). Apesar destes estudos, o mecanismo concreto pelo qual o nitrato alimentar beneficia a função endotelial permanece desconhecido (acredita-se que se deva ao facto do NO atuar na ativação da guanilato-ciclase solúvel), mas estes dados comprovam os benefícios do nitrato proveniente da dieta no nosso organismo.

5.2.3 - Rigidez arterial

Com o envelhecimento as artérias vão ficando mais rígidas devido a fatores estruturais como o aumento de colagénio (fibrose) e a diminuição da elastina, proteínas responsáveis pela rigidez e elasticidade respetivamente. No entanto fatores funcionais também têm um papel na

modulação do tónus do músculo liso vascular, e um dos fatores funcionais mais importantes é o NO . Um dos testes para avaliar a rigidez arterial é o teste de velocidade de onda de pulso carótida-femoral (VOP aórtica), em que quanto maior este valor, maior a rigidez.

Num estudo realizado por Lefer e colegas foi verificado que o valor de VOP aórtica estava consideravelmente elevado em ratos mais velhos quando comparado com ratos mais novos. Estes ratos mais velhos foram tratados com um suplemento de nitrito de sódio que levou à redução dos valores de VOP aórtica para níveis equivalentes aos dos ratos de menor idade (Lefer e Seals, 2012).

Mais tarde, estes efeitos do nitrito de sódio na rigidez arterial foram investigados. Os valores de VOP aórtica nos ratos mais velhos estavam mais altos, não só devido aos níveis elevados de fator de crescimento transformante beta ($\text{TFG-}\beta$) na camada adventícia e de colagénio da aorta, mas também devido aos níveis baixos de elastina na camada média dos vasos e à grande quantidade de produtos finais de glicosilação avançada (PGAs) na camada adventícia e média. O nitrito de sódio diminuiu os valores de VOP aórtica mas não teve qualquer influência nos níveis de colagénio, $\text{TFG-}\beta$ e elastina. Já a suplementação com nitrito normalizou os valores de AGEs nas camadas média e adventícia na aorta dos ratos mais velhos (Fleenor *et al.*, 2012).

Até ao momento não há conhecimento de estudos que comprovem o efeito do nitrito na diminuição de VOP aórtica em humanos, no entanto num estudo mais recente é verificado que uma suplementação de nitrito de sódio durante 4 semanas é suficiente para baixar os valores de VOP aórtica em humanos mais velhos com fatores de risco cardiovasculares (Sindler *et al.*, 2014).

Estes estudos levam a concluir que a suplementação oral de nitrito ou nitrato inorgânico poderá levar a consequências positivas no envelhecimento arterial, que se acredita ser um dos antecedentes clínicos importantes das doenças cardiovascular, com a diminuição do enrijecimento da arterial (Sindler *et al.*, 2014).

5.2.4 - Função plaquetária

O controlo da função plaquetária é de extrema importância principalmente na prevenção de fenómenos tromboembólicos. Assim, como já referido, devido às suas propriedades vasodilatadoras, antiagregantes e anti adesivas, o NO inibe a adesão plaquetária (Gilchrist, Winyard e Benjamin, 2010; Webb *et al.*, 2010). O NO , ao interagir com a guanilato

ciclase plaquetária, promove a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc (monofosfato cíclico de guanosina) e, ao mesmo tempo, inibe o influxo de cálcio que por sua vez inibe ligação do fibrinogénio ao receptor da glicoproteína IIb / IIIa. Assim, como a ligação de fibrinogénio é essencial para a agregação plaquetária este parece ser o mecanismo pelo qual o NO influencia a agregação plaquetar.

De notar que não está provado que a suplementação com nitrato tenha o mesmo efeito de prevenção de eventos vasculares como a aspirina e outros agentes anti-plaquetários (Gilchrist, Winyard e Benjamin, 2010).

5.3 - Sistema nervoso central

5.3.1- Corrente sanguínea cerebral e função cognitiva

É sabido que o NO desempenha um papel fundamental na regulação do fluxo sanguíneo cerebral e no acoplamento da atividade neural à perfusão (Presley *et al.*, 2012).

Wang *et al.* em 2005 demonstraram que o NO ao ligar-se ao GMPc ativa cascatas de sinalização funcionando assim como um mensageiro pós- e pré-sináptico. Como mensageiro retrógrado, o NO ativa a proteína G que fosforila a sinaptofisina. Esta glicoproteína é essencial para a fusão de grânulos que contenham glutamato com a membrana pré-sináptica das terminações nervosas. Assim o NO funciona como um regulador excitatório da neurotransmissão (Weitzberg e Lundberg, 2013).

5.4 - Efeitos metabólicos

5.4.1 - Consumo de oxigénio e exercício físico

A atividade física está associada a uma diminuição da concentração de oxigénio nos músculos e, como referido anteriormente, um estado de hipóxia favorece a redução de nitrato a NO .

Assim, será de esperar que o NO tenha algum impacto na performance de exercício físico. Com efeito, Larsen e colegas demonstraram, através de um estudo em indivíduos saudáveis, que a suplementação de nitrato não só reduz o consumo de oxigénio durante o exercício físico, mas também o custo energético de trifosfato de adenosina (ATP) na realização de esforço muscular (Bailey *et al.*, 2010).

Estudos mais recentes realizados em roedores apontam outros benefícios tais como melhoria na contratilidade muscular e vasodilatação seletiva em grupos musculares (Jones, 2014).

6. Efeitos terapêuticos e fisiológicos do nitrato produzido endogenamente

Após referidos todos estes aspetos positivos do nitrato ingerido através da dieta, é também importante percebermos a importância do nitrato produzido pelo nosso organismo e qual o seu papel.

Ahluwalia e os seus colaboradores realizaram um estudo em que vários voluntários saudáveis iniciaram uma dieta pobre em nitrato de forma a diminuir a influência do nitrato alimentar nos resultados. Além disso, estes voluntários também fizeram uma lavagem bucal antibacteriana. Bastou apenas uma semana para que o pico de nitrito no plasma baixasse cerca de 25% em comparação com a semana de controlo. Esta observação traduziu-se num aumento da pressão arterial. Assim, a equipa concluiu que a “reciclagem” endógena de nitrato realizada pelas bactérias localizadas na cavidade oral é suficiente para ter impacto no pico de nitrito no plasma e conseqüentemente afetar a homeostase vascular do NO e da pressão arterial (Kapil *et al.*, 2013).

7. Conclusão

É certo que o nitrato tem uma imagem negativa na sociedade, muito devido aos efeitos negativos na nossa saúde a que este é associado, principalmente no que toca aos possíveis efeitos carcinogénicos. E isto causou bastante impacto no nosso dia-a-dia, quer através da regulamentação relativa à produção de certos alimentos, quer na imposição de limites à sua ingestão diária.

Felizmente, a ciência está em evolução constante e novas descobertas sobre o nitrato começam a mudar o paradigma que se vivia já há alguns anos. Estando o nitrato presente em produtos normalmente associados a efeitos benéficos para a nossa saúde (por exemplo na dieta mediterrânea rica em vegetais) algo parecia não estar certo, pois levantava a questão “Como é possível algo prejudicial para a saúde humana estar presente em produtos como frutas e vegetais, produtos estes cujo consumo é entusiasticamente aconselhado?”. De facto,

com a descoberta das modificações sofridas pelo nitrato, novas questões surgiram com o intuito de descobrir qual o impacto que estes novos compostos formados poderiam trazer ao nosso organismo.

Assim vários estudos nesta área foram iniciados e ideia negativa do nitrato que perdurava há algum tempo começou a ser questionada.

Ao ser descoberto que o nitrito era convertido a $^{\cdot}\text{NO}$ e outros compostos endogenamente (através da redução efetuada por algumas proteínas/enzimas) e que não era excretado na sua totalidade começou a ser perceptível que este teria, muito provavelmente, que exercer algum papel em processos fisiológicos. E assim novas vantagens em várias áreas foram atribuídas ao consumo de nitrato. Foram descobertos efeitos benéficos a nível gástrico, cardíaco entre outros.

Com estas descobertas podemos questionar o facto de, apesar da falta de evidências concretas, os efeitos negativos atribuídos ao nitrato terem sido amplamente difundidos pela população em geral. Coloca também em causa todas as regulamentações e limites impostos no consumo de nitrato e se realmente estas foram benéficas para a população ou se, em última instância, inibiram o consumo de um composto benéfico para a nossa saúde.

Podemos, assim, dizer que é necessário dar continuidade a estudos neste campo pois as perspetivas positivas são muito promissoras.

Apesar da ideia dilatória que existe há tanto tempo sobre as consequências do consumo de nitrato, atualmente já é possível começar a acreditar que os efeitos benéficos ultrapassam os riscos para a nossa saúde.

8. Referências Bibliográficas

BAILEY, Stephen J. *et al.* - Dietary nitrate supplementation enhances muscle contractile efficiency during knee-extensor exercise in humans. **Journal of Applied Physiology**. . ISSN 87507587. 109:1 (2010) 135–148. doi: 10.1152/jappphysiol.00046.2010.

BENJAMIN, N. *et al.* - Stomach NO synthesis. **Nature**. England. . ISSN 0028-0836 (Print). 368:6471 (1994) 502. doi: 10.1038/368502a0.

BJÖRNE, Håkan; WEITZBERG, Eddie; LUNDBERG, Jon O. - Intra-gastric generation of antimicrobial nitrogen oxides from saliva--physiological and therapeutic considerations. **Free radical biology & medicine**. United States. . ISSN 0891-5849 (Print). 41:9 (2006) 1404–1412. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.07.020.

BRYAN, Nathan S.; GRINSVEN, Hans VAN - **The Role of Nitrate in Human Health**. [S.l.] : Elsevier, (2013) Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-407247-3.00003-2>. ISBN 9780124072473.

CHIKAN, Naveed A. *et al.* - N-Nitrosodimethylamine in the Kashmiri diet and possible roles in the high incidence of gastrointestinal cancers. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. . ISSN 2476762X. 13:3 (2012) 1077–1079. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.3.1077.

DYKHUIZEN, R. S. *et al.* - Antimicrobial Effect of Acidified Nitrite on Gut Pathogens: the Importance of Dietary Nitrate in Host Defence. **Managing Risks of Nitrates to Humans and the Environment**. 40:6 (1999) 295–316. doi: 10.1533/9781845693206.295.

DŽOLJIĆ, Eleonora; GRABATINIĆ, Ivan; KOSTIĆ, Vladimir - Why is nitric oxide important for our brain? **Functional Neurology**. . ISSN 19713274. 30:3 (2015) 159–163. doi: 10.11138/fneur/2015.30.3.159.

FEWTRELL, Lorna - Drinking-water nitrate, methemoglobinemia, and global burden of disease: A discussion. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 00916765. 112:14 (2004) 1371–1374. doi: 10.1289/ehp.7216.

FLEENOR, Bradley S. *et al.* - Sodium nitrite de-stiffening of large elastic arteries with aging: role of normalization of advanced glycation end-products. **Experimental gerontology**. . ISSN 1873-6815. 47:8 (2012) 588–594. doi: 10.1016/j.exger.2012.05.004.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. - Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**. ISSN 0195668X. 33:7 (2012) 829–837.

- GEHR, P. - Swiss Medical Weekly Young Investigator's Award 2003: Clustering of cardiovascular risk factors mimicking the human metabolic syndrome X in eNOS null mice. **Swiss medical weekly**. Switzerland. . ISSN 1424-7860 (Print). 134:19–20 (2004) 267.
- GILCHRIST, Mark; WINYARD, Paul G.; BENJAMIN, Nigel - Dietary nitrate - Good or bad? **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**. . ISSN 10898603. 22:2 (2010) 104–109. doi: 10.1016/j.niox.2009.10.005.
- GREEN, L. C. *et al.* - Nitrate biosynthesis in man. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 00278424. 78:12 II (1981) 7764–7768. doi: 10.1073/pnas.78.12.7764.
- HEISS, Christian *et al.* - Dietary inorganic nitrate mobilizes circulating angiogenic cells. **Free radical biology & medicine**. United States. . ISSN 1873-4596 (Electronic). 52:9 (2012) 1767–1772. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.051.
- HOHENSINN, Barbara *et al.* - Sustaining elevated levels of nitrite in the oral cavity through consumption of nitrate-rich beetroot juice in young healthy adults reduces salivary pH. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**. . ISSN 10898611. 60:2 (2016) 10–15. doi: 10.1016/j.niox.2016.08.006.
- HORD, Norman G.; TANG, Yaoping; BRYAN, Nathan S. - Food sources of nitrates and nitrites: The physiologic context for potential health benefits. **American Journal of Clinical Nutrition**. . ISSN 00029165. 90:1 (2009) 1–10. doi: 10.3945/ajcn.2008.27131.
- HUANG, P. L. *et al.* - Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. **Nature**. England. . ISSN 0028-0836 (Print). 377:6546 (1995) 239–242. doi: 10.1038/377239a0.
- IARC, (Internation Agency For Research On Cancer) - World health organization international agency for research on cancer. **Iarc Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans**. 94:(2010) 1–464.
- ISLAM, Badar Ul *et al.* - Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). **Indian Journal of Clinical Biochemistry**. . ISSN 09740422. 30:4 (2015) 368–385. doi: 10.1007/s12291-014-0475-8.
- JONES, Andrew M. - Dietary nitrate supplementation and exercise performance. **Sports Medicine**. . ISSN 11792035. 44:SUPPL.1 (2014). doi: 10.1007/s40279-014-0149-y.

KAPIL, Vikas *et al.* - Inorganic nitrate supplementation lowers blood pressure in humans: Role for nitrite-derived no. **Hypertension**. . ISSN 0194911X. 56:2 (2010) 274–281. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153536.

KAPIL, Vikas *et al.* - Physiological role for nitrate-reducing oral bacteria in blood pressure control. **Free Radical Biology and Medicine**. . ISSN 08915849. 55:(2013) 93–100. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.013.

KARWOWSKA, Małgorzata; KONONIUK, Anna - Nitrates/nitrites in food—risk for nitrosative stress and benefits. **Antioxidants**. . ISSN 20763921. 9:3 (2020) 1–17. doi: 10.3390/antiox9030241.

KOCH, Carl D. *et al.* - Enterosalivary nitrate metabolism and the microbiome: Intersection of microbial metabolism, nitric oxide and diet in cardiac and pulmonary vascular health. **Free Radical Biology and Medicine**. . ISSN 18734596. 105:(2017) 48–67. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.015.

LARSSON, K. *et al.* - Estimated dietary intake of nitrite and nitrate in Swedish children. **Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment**. England. . ISSN 1944-0057 (Electronic). 28:5 (2011) 659–666. doi: 10.1080/19440049.2011.555842.

LEFER, David J.; SEALS, Douglas R. - Dysfunction and Large Elastic Artery Stiffness With Aging. 10:3 (2012) 429–437. doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00679.x.Nitrite.

LUNDBERG, Jon O.; CARLSTRÖM, Mattias; WEITZBERG, Eddie - Metabolic Effects of Dietary Nitrate in Health and Disease. **Cell Metabolism**. . ISSN 19327420. 28:1 (2018) 9–22. doi: 10.1016/j.cmet.2018.06.007.

LUNDBERG, Jon O.; GOVONI, Mirco - Inorganic nitrate is a possible source for systemic generation of nitric oxide. **Free radical biology & medicine**. United States. . ISSN 0891-5849 (Print). 37:3 (2004) 395–400. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.027.

LUNDBERG, Jon O.; WEITZBERG, Eddie; GLADWIN, Mark T. - The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**. . ISSN 14741776. 7:2 (2008) 156–167. doi: 10.1038/nrd2466.

MA, Linsha *et al.* - Nitrate and nitrite in health and disease. **Aging and Disease**. . ISSN 21525250. 9:5 (2018) 938–945. doi: 10.14336/AD.2017.1207.

MAGEE, P. N.; BARNES, J. M. - The production of malignant primary hepatic tumours in the

rat by feeding dimethylnitrosamine. **British Journal of Cancer**. . ISSN 15321827. 10:1 (1956) 114–122. doi: 10.1038/bjc.1956.15.

MORO, María A. *et al.* - cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: Confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. . ISSN 00278424. 93:4 (1996) 1480–1485. doi: 10.1073/pnas.93.4.1480.

PEREIRA, Cassilda *et al.* - The redox interplay between nitrite and nitric oxide: From the gut to the brain. **Redox Biology**. . ISSN 22132317. 1:1 (2013) 276–284. doi: 10.1016/j.redox.2013.04.004.

PRESLEY, Tennille D. *et al.* - adults. 24:1 (2012) 34–42. doi: 10.1016/j.niox.2010.10.002.Acute.

ROCHA, Bárbara S. *et al.* - Pepsin is nitrated in the rat stomach, acquiring antiulcerogenic activity: a novel interaction between dietary nitrate and gut proteins. **Free radical biology & medicine**. United States. . ISSN 1873-4596 (Electronic). 58:(2013) 26–34. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.017.

SCHOPFER, Francisco J. *et al.* - Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: Nitrolinoleic acid is a hydrophobically stabilized nitric oxide donor. **Journal of Biological Chemistry**. . ISSN 00219258. 280:19 (2005) 19289–19297. doi: 10.1074/jbc.M414689200.

SINDLER, Amy L. *et al.* - Inorganic nitrite supplementation for healthy arterial aging. **Journal of Applied Physiology**. . ISSN 15221601. 116:5 (2014) 463–477. doi: 10.1152/jappphysiol.01100.2013.

STEIN, Lisa Y.; KLOTZ, Martin G. - The nitrogen cycle. **Current Biology**. . ISSN 09609822. 26:3 (2016) R94–R98. doi: 10.1016/j.cub.2015.12.021.

TANNENBAUM, S. R. *et al.* - Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. **Journal of the National Cancer Institute**. United States. . ISSN 0027-8874 (Print). 53:1 (1974) 79–84.

WARD, Mary H. *et al.* - Workgroup report: Drinking-water nitrate and health - Recent findings and research needs. **Environmental Health Perspectives**. . ISSN 00916765. 113:11 (2005) 1607–1614. doi: 10.1289/ehp.8043.

WEBB, Andrew J. *et al.* - Properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite. **Hypertension**. 51:3 (2010) 784–790. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.103523.Acute.

WEITZBERG, Eddie; LUNDBERG, Jon O. - Novel Aspects of Dietary Nitrate and Human Health. **Annual Review of Nutrition**. . ISSN 0199-9885. 33:1 (2013) 129–159. doi: 10.1146/annurev-nutr-071812-161159.