



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DE RISCOS PARA A SAÚDE RESULTANTES DE
MISTURAS DE METAIS POTENCIALMENTE PRESENTES EM
MEDICAMENTOS**

Trabalho submetido por
Milene Filipa de Jesus Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professor Doutor José de Brito

março de 2017



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DE RISCOS PARA A SAÚDE RESULTANTES DE
MISTURAS DE METAIS POTENCIALMENTE PRESENTES EM
MEDICAMENTOS**

Trabalho submetido por
Milene Filipa de Jesus Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Professor Doutor José de Brito

março de 2017

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero dar agradecer ao Professor Doutor José de Brito, pela competência científica e pela orientação que tornou possível a realização desta monografia.

Aos meus grandes e inesquecíveis amigos Miguel Silvestre, Andreia Palma, Catarina Cavaco e Tatiana Guedes Silva, por fazerem parte da minha vida, e sem dúvida alguma deram outro sentido à minha passagem pela Egas Moniz, vocês fizeram parte dos melhores momentos desta grande jornada.

Muito obrigada Paula Brejo e Andreia Caldeira por me terem recebido em suas casas, momentos que vou recordar para toda a vida, já sinto saudades.

A Marina a minha companheira das horas difíceis. Ao Valter por todo o apoio prestado. Cláudia obrigada pelo meu último dia da época de exames, ficou no coração.

O último e mais importante agradecimento deixo-o à minha família, aos meus pais, aos meus avós e ao meu namorado, por todo o incentivo, ajuda, compreensão sempre demonstrados em todas as etapas da minha vida e especialmente pela paciência nestes últimos meses, sem vocês não teria sido possível.

Resumo

Os avanços tecnológicos e científicos que se têm registado no setor farmacêutico, permitiram a descoberta e a produção de novas moléculas, este fator associado ao aumento da esperança média de vida faz com que sejamos medicados com um maior número de fármacos e durante um maior período de tempo. Esta associação de fatores faz com que a exposição aos resíduos presentes nos fármacos adquira uma importância relevante.

O presente trabalho é uma revisão da literatura, com o intuito de selecionar artigos válidos para o tema proposto. Assim, ao longo deste trabalho serão mencionados os critérios de avaliação do risco, as legislações em vigor, bem como as principais consequências para a saúde, decorrentes da exposição a misturas de impurezas metálicas presentes em fármacos.

A análise efetuada demonstrou que as misturas de metais podem ter grandes riscos para a saúde. Contudo, ainda existem algumas lacunas para prever e calcular os riscos decorrentes da mistura de impurezas metálicas contidas nos fármacos.

Palavras-chave: Impurezas metálicas. Avaliação de risco. Toxicidade de metais. Misturas de metais.

Abstract

The technological and scientific advances in the pharmaceutical sector allowed the discovery and production of new molecules and this factor together with the increase in the average life expectancy results that we are medicated with a greater number of medications and for a longer period of time. This combination of factors makes the exposure to residues in drugs acquires a relevant importance.

This work is a review of the literature, with the intention of selecting articles valid for the proposed theme. Thus throughout this work will be mentioned the risk assessment criterion, the legislation in force, as well as the main health consequences of exposure to mixtures of metal impurities present in medications.

The analysis has shown that metal blends can pose major health risks. However there are still some gaps to predict and calculate the risks arising from the mixture of metallic impurities contained in the medications.

Keywords: Metal impurities. Risk assessment. Metal toxicity. Metal mixtures.

Índice Geral

Índice de figuras	3
Índice de tabelas	5
Lista de abreviaturas.....	7
1. Introdução	9
2. Possíveis origens da contaminação dos fármacos por metais.....	13
3. Avaliação do risco	15
4. Interações metal-metal.....	19
5. Legislação em vigor.....	23
5.1. Agência Europeia do Medicamento (EMA).....	23
5.2. Conferência internacional sobre Harmonização (ICH).....	26
5.3. Farmacopeias.....	29
5.4. Aplicabilidade da legislação em vigor	31
6. Toxicidade de metais	33
6.1. Arsénio (As)	34
6.2. Cádmio (Cd).....	35
6.3. Chumbo (Pb)	36
6.4. Ferro (Fe)	37
6.5. Zinco (Zn)	37
6.6. Vanádio (V)	38
6.7. Platina (Pt).....	39
6.8. Paládio (Pd).....	39
6.9. Níquel (Ni)	39
6.10. Manganês (Mn)	40
6.11. Cobre (Cu).....	41
6.12. Crómio (Cr).....	41

6.13. Mercúrio (Hg)	42
7. Métodos e técnicas para a qualificação e quantificação dos metais presentes nos fármacos.....	43
8. Consequências para a saúde da associação dos metais	47
Bibliografia.....	53

Índice de figuras

Figura 1- Diagrama representante da contribuição global das impurezas durante o processo de fabrico	14
Figura 2- Efeito Aditivo	20
Figura 3- Efeito Sinérgico	20
Figura 4- Efeito Antagonista	21

Índice de tabelas

Tabela 1 - Limites de exposição e concentração, em reagentes e catalisadores metálicos	25
Tabela 2 - Classificação de impurezas metálicas	28

Lista de abreviaturas

As – Arsénio

BML – Modelo do ligante biótico

BPF – Boas práticas de farmácia

Ca – Cálcio

Cd – Cádmio

Cr – Crómio

Cu – Cobre

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EMA- Agencia Europeia do Medicamento (*European Medicines Agency*)

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

Fe – Ferro

GC-MS – Cromatografia de camada fina de alto rendimento

Hg – Mercúrio

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho

HPTLC – Cromatografia em camada fina de alta resolução

HRMS – Espectrometria de massa de alta resolução

ICH – Conferência internacional sobre harmonização (*Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*)

ICP-OES – Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente

ICP-MS – Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente

Ir – Iridio

LC-MS – Espectrometria líquida de cromatografia de massa

Mn – Manganês

Mo – Molibdénio

MT – Metaloteneína

Ni – Níquel

NOAEL – Valor onde não são observados efeitos adversos (*No Observed Adverse Effects Level*)

Os – Osmio

QI – Quociente de inteligência

Pb – Chumbo

PDE – Exposição diária permitida do resíduo de metal

PE – Farmacopeia Europeia

Pt – Platina

Rh - Ródio

RMN – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Ru – Rútenio

SNC – Sistema nervoso central

TLC – Cromatografia de camada fina

UPLC – Cromatografia de ultra performance líquida

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos

V – Vonádio

XRF – Espectrometria de fluorescência de raio-X

WDXRF – Espectrometria de fluorescência de raio-X por dispersão de comprimento de onda

Zn- Zinco

1. Introdução

A indústria farmacêutica tem elevada relevância na economia mundial atual. Um dos principais focos desta indústria é o desenvolvimento de novos medicamentos, sendo que entre 2005 e 2014 a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) aprovou 268 novos medicamentos (Ramachandra, 2016). Todo o desenvolvimento tecnológico e industrial que se tem constatado nesta área, para além de benefícios e conforto tem também causado efeitos adversos, podendo comprometer a saúde e consequentemente a qualidade de vida do Homem (Rocha, 2009), (Ferreira, Horta, & Cunha, 2010), (Rodrigues, Bueno, Fonseca, Alonzo, H. G. A. Villardi, & Costa, L. C. A. Rohlf, 2011). O controlo de qualidade, a segurança e a eficácia dos fármacos são áreas de elevado interesse para as autoridades reguladoras. Atualmente as análises farmacêuticas são utilizadas para proporcionarem dados precisos e exatos, tanto a nível da descoberta e desenvolvimento da substância ativa, como no controlo de qualidade e na segurança do fármaco (Ramachandra, 2016).

A quantificação de impurezas é essencial, pois elas são uma causa da contaminação do fármaco, levando não só a diminuição da sua eficácia como também ao surgimento de efeitos adversos (Ramachandra, 2016), (Figueiredo, Fernandes, Costa, Gonçalves, & Brito, 2016).

Os metais são substâncias que interagem naturalmente nos ciclos biológicos (Rocha, 2009), (Ferreira et al., 2010), podendo ser classificados como essenciais ou não-essenciais. São considerados elementos essenciais o ferro (Fe), o cobre (Cu), o zinco (Zn), o níquel (Ni), o vanádio (V), o cromo (Cr) e o manganês (Mn), pois encontram-se presentes nos organismos vivos, sendo importantes em diversos processos moleculares e celulares. Alguns destes elementos são encontrados com elevada frequência, no meio ambiente, na água, nos alimentos, em suplementos alimentares e fármacos (Ferreira et al., 2010), (Izah, Inyang, Angaye, & Okowa, 2016), (Allan, 1997), (Mohamed et al., 2016). São considerados elementos não essenciais o cádmio (Cd), o chumbo (Pb), o mercúrio (Hg) e o arsénio (As). Estes elementos são potencialmente tóxicos e provocam reações adversas mesmo em baixas concentrações. Os metais não essenciais não existem naturalmente no corpo humano, não desempenhando portanto funções nutricionais ou bioquímicas, sendo que quando se encontram no organismo podem desenvolver toxicidade. Contudo, mesmo os metais considerados essenciais podem provocar toxicidade, dependendo da sua concentração (Friberg L, Nordberg G,

1979), (Ferreira et al., 2010), (Izah et al., 2016), (Allan, 1997), (Mohamed et al., 2016), (Gasser, Klier, Kühn, & Steinhoff, 2009), (Muniz & Oliveira-Filho, 2008).

Como os metais essenciais estão sujeitos a mecanismos homeostáticos, tais como controlo da absorção intestinal e a presença de proteínas específicas de transporte, geralmente não apresentam efeitos tóxicos. A competição entre os elementos essenciais e os elementos tóxicos para os locais de ligação da proteína está na base da toxicidade de alguns deles. Os efeitos tóxicos dos elementos são em parte devidos à inibição direta dos sistemas enzimáticos, devido a alteração indireta do equilíbrio de iões metálicos essenciais, e por conseguinte à inibição da sua biodisponibilidade (Apostoli, 2002).

O efeito tóxico de um metal depende da interação com o organismo humano. Os metais encontram-se em diferentes formas físicas e químicas, podendo modificar-se para interagir com as características anatómicas e propriedades fisiológicas dos órgãos ou sistemas vivos. A absorção difere qualitativamente e quantitativamente, dependendo da via em que ocorre, se através do trato gastro intestinal, nos pulmões ou na pele. Após a absorção, os elementos geralmente são transportados pelo fluxo sanguíneo e passam para os fluidos celulares, onde exercem o seu efeito tóxico. Os metais têm uma forte tendência para formar compostos de coordenação (catiões metálicos de ligação orgânica), garantindo que os metais in vivo são complexados com determinados grupos biológicos, como sulfidrílico (-SH), amínico (-NH₂), oxidrílico (-OH), disulfúrico (-SS), carboxílico (-COOH). A ligação do metal com qualquer um dos componentes do sistema pode afetar toda a sua função. Os resultados dessas interações são alterações bioquímicas a nível celular, que conseqüentemente levam à apresentação de sintomas clínicos, localizados ou sistémicos. A última fase de interação do metal com o organismo é a excreção, que ocorre principalmente através da urina e das fezes.

O conhecimento dos mecanismos de ação dos metais é de extrema importância não só para identificar os possíveis alvos e respetivos biomarcadores de efeito, mas também na escolha do método analítico mais adequado (Apostoli, 2002).

A caracterização do tempo de exposição é de elevada relevância, uma vez que pode influenciar a rapidez de absorção dos diferentes agentes tóxicos. A exposição pode caracterizar-se como aguda, subaguda ou crónica. É considerada como exposição aguda, uma exposição que decorre num período de 24 horas. A exposição subaguda pode resultar de exposições repetidas e normalmente desenvolve-se em dias ou semanas. A exposição crónica decorre em longos períodos de tempo, e desenvolve-se durante meses

ou anos (Félix, 2007), (Dragun, Tomic, & Puntaric, 2010), (Organização Mundial da Saúde, 2000).

Na avaliação de exposição a substâncias tóxicas são relevantes os fatores tais como a dose, duração da exposição e as vias de exposição (oral, inalatória ou parentérica). Nesta avaliação também é relevante a idade, o sexo, o estado de nutrição e a saúde do doente (Félix, 2007). Para avaliar o risco é essencial conhecer-se o metal e o seu perfil toxicológico, de forma a prever os potenciais efeitos no organismo humano. Estes efeitos podem ser avaliados através do doseamento de marcadores biológicos.

As misturas de metais podem acentuar os efeitos nocivos para a saúde, uma vez que o seu efeito tóxico pode atuar individualmente, ou em associação entre os diferentes metais. Tendo em conta as diversas fontes ambientais de metais, vários cenários de exposição podem ser esperados. Dependendo do nível de exposição, os efeitos tóxicos induzidos pelos metais podem ser previstos na população exposta. Diversos efeitos tóxicos de metais específicos têm sido exaustivamente descritos por vários autores, no entanto, pouco se sabe sobre os efeitos relacionados com a exposição a associações de diversos metais. Este facto é de extrema relevância, já que a exposição humana aos metais raramente é limitada a um único elemento (Calderón, Ortiz-Pérez, Yáñez, & Díaz-Barriga, 2003).

Ao longo deste trabalho serão mencionados os critérios de avaliação do risco, as legislações em vigor, bem como as principais consequências para a saúde, decorrentes da exposição a misturas de impurezas metálicas presentes em fármacos.

2. Possíveis origens da contaminação dos fármacos por metais

Os fármacos podem incorporar diversas impurezas, entre as quais resíduos metálicos. Durante o processo de fabrico de um medicamento, existem diversas fontes de possíveis contaminações, por exemplo através de resíduos provenientes de elementos adicionados intencionalmente na sua preparação (substância ativa, excipientes, catalisadores, reagentes, água, etc.), ou mesmo através dos equipamentos utilizados durante o processo de fabrico (material de fabrico, tubos, embalagens, solventes de limpeza, meio ambiente, etc.) (Holm & Elder, 2016), (EMA European Medicines Agency, 2008), (ICH, 2013), (Gonçalves, Costa, & Brito, 2011), (Figueiredo et al., 2016), (Wollein, Bauer, Habernegg, & Schramek, 2015).

A natureza do material de fabrico deve ser considerada não só na fase de produção mas também durante o armazenamento do produto acabado, desde que o material entre em contacto direto com o fármaco (Gomes & Virg, n.d.), (Geral, n.d.), (Gonçalves et al., 2011). Na fase de produção do fármaco, na maioria dos casos é aconselhável a utilização de recipientes de aço inox, uma vez que estes são resistentes à maioria das substâncias. Recipientes contendo metais como o ferro, cobre ou alumínio são incompatíveis com medicamentos ácidos ou básicos, pois podem dar origem a complexos tóxicos. A embalagem final do produto farmacêutico também é de extrema importância para a preservação da integridade do produto, para além de constituir uma barreira de proteção contra o meio externo, está em contacto direto com o fármaco. Os recipientes de vidro são vastamente utilizados, mas alguns tipos de vidro são incompatíveis com determinadas substâncias (Gomes & Virg, n.d.).

Atualmente, espécies de origem vegetal são amplamente utilizadas pela indústria farmacêutica a nível mundial. As plantas medicinais contêm elementos essenciais e oligoelementos necessários ao corpo humano, mas para muitos destes elementos existe uma margem estreita entre a deficiência e a toxicidade. A constituição dos principais elementos e oligoelementos nas plantas é estabelecida tanto pelas características geoquímicas dos vegetais e pelas características dos solos, como pela capacidade das plantas acumularem elementos do ambiente aéreo ou aquático circundante. Os metais apresentam uma possível influência sobre os efeitos farmacológicos das plantas, desta forma os teores de metal precisam ser conhecidos. A concentração de metais pesados é um dos critérios seletivos para a utilização de plantas na produção de drogas sintéticas

(May, 2005), (Honary et al., 2016), (Gomez, Cerutti, Olsina, Silva, & Martínez, 2004), (Gasser et al., 2009).

Contudo, as impurezas que são encontradas nos fármacos com maior abundância são provenientes de excipientes ou reagentes utilizados para a produção do fármaco. Estes são mais fáceis de detetar relativamente a outras possíveis fontes de contaminação, pois a sua inclusão no processo de fabrico é à partida já conhecida.

É possível minimizar-se a contaminação proveniente dos equipamentos utilizados durante o processo de fabrico, através do conhecimento de todo o processo, da seleção dos equipamentos e da qualificação dos mesmos, e ainda do controle das boas práticas de farmácia (BPF).

O sistema de fecho do recipiente tem por base identificar impurezas, através da compreensão científica das possíveis interações entre o medicamento e a sua embalagem (ICH, 2013).

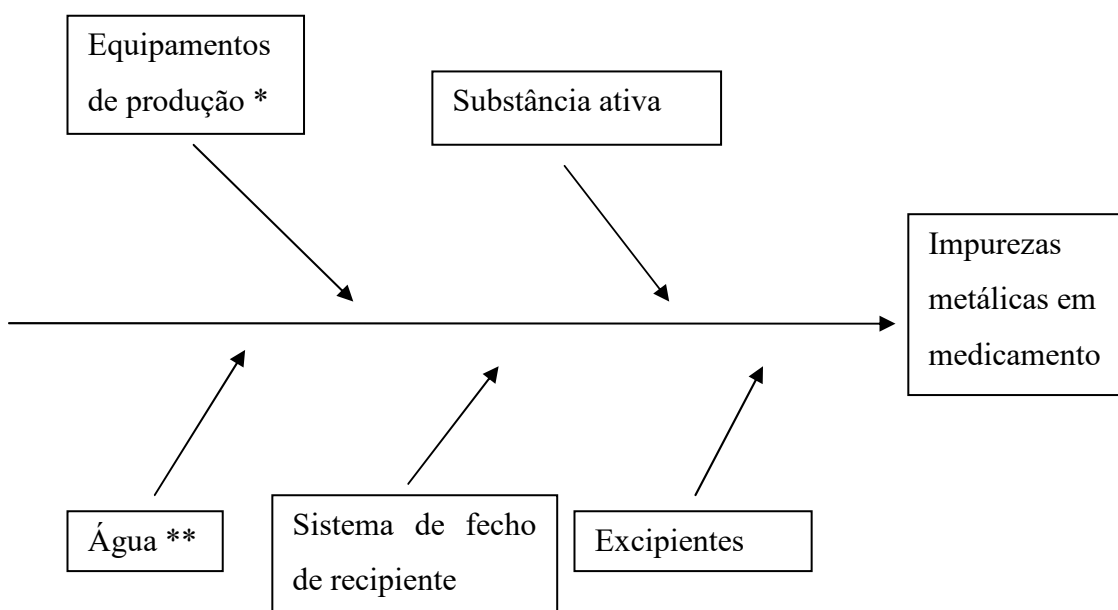


Figura 1- Diagrama representante da contribuição global das impurezas durante o processo de fabrico, adaptado de (ICH, 2013)

*O risco de introdução de impurezas no medicamento pode ser reduzido através da escolha dos equipamentos

**O risco de introdução de impurezas através da água pode ser reduzido

3. Avaliação do risco

As misturas químicas apresentam uma grande variabilidade e complexidade, deste modo a avaliação dos efeitos tóxicos dessas misturas é muito difícil. Contudo surge a necessidade de calcular o risco de exposição a essas misturas (EU, 2011).

O risco pode definir-se como a probabilidade de efeitos adversos resultarem da exposição a determinada substância. É necessário avaliar o risco para poder estabelecer níveis de segurança, valores para os quais não resultarão efeitos adversos (Organização Mundial da Saúde, 2000).

Uma das principais formas de avaliar o risco é determinar o nível de exposição a uma determinada substância, que não apresente danos significativos à saúde humana (Organização Mundial da Saúde, 2000), (Lentz et al., 2015) .

Na avaliação do risco é importante verificar a importância das substâncias químicas na sociedade, e o seu potencial perigo para a saúde, procurando minimizar a exposição e diminuindo os riscos.

Nessa avaliação podem ser efetuados testes de toxicidade em animais, análise da exposição à substância e estudos epidemiológicos em populações expostas a uma determinada substância química.

Os dois principais métodos utilizados, para obter informações sobre os efeitos para a saúde resultantes da exposição a substâncias químicas, são os estudos com populações humanas e estudos de toxicidade usando animais de laboratório.

Os dados sobre a toxicidade de substâncias obtidos através da avaliação no homem, são mais relevantes e fidedignos para avaliar os riscos, do que os obtidos através da avaliação em animais. Contudo, experiências realizadas em humanos com substâncias tóxicas ou potencialmente tóxicas são limitadas por questões éticas, só podendo ser usados os dados obtidos através de estudos epidemiológicos em situações de exposição. Esses dados por vezes não são de fácil interpretação, por falta de informações quantitativas sobre as concentrações às quais houve exposição e a possibilidade de exposição concomitante a outras substâncias (Organização Mundial da Saúde, 2000).

Na maioria das substâncias se a dose estiver abaixo do limite (NOAEL- No Observed Adverse Effects Level), não ocorre efeito tóxico. Esse limite é deduzido pelo valor de concentração ou dose acima da qual poderá haver efeito adverso, sendo que a

baixo desse valor o efeito adverso não é observado (Organização Mundial da Saúde, 2000).

Outra forma de calcular o risco é através de biomarcadores ou marcadores biológicos. Os biomarcadores são variáveis biológicas que podem ser medidas experimentalmente e indicam a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica, ou uma resposta a um agente farmacológico num determinado organismo. Os biomarcadores podem ser de diversos tipos, fisiológicos (funções de um órgão), físicos (alterações características em estruturas biológicas), histológicos (amostras de tecido) e anatómicos. Podem ser células específicas, moléculas, genes, enzimas ou hormonas (Kakkar & Jaffery, 2005).

- Biomarcadores de exposição – são obtidos a partir da medição da substância em estudo ou dos seus metabolitos em amostras biológicas, os níveis de metais geralmente são determinados a partir de amostras de sangue ou urina.
- Biomarcadores de suscetibilidade – refletem a capacidade de um organismo responder a um estímulo causado pela exposição a uma determinada substância.
- Biomarcadores de efeito – é essencial conhecer os mecanismos de toxicidade nos tecidos das substâncias a avaliar, prevendo assim o seu efeito (Andrade, Mateus, Batoréu, Aschner, & Santos, 2015).

Se os componentes de uma mistura não são geralmente bem conhecidos, são necessários critérios para definir os componentes relevantes de uma mistura. Esses critérios não podem basear-se simplesmente nas concentrações dos compostos da mistura, devem também focar-se na contribuição esperada para os parâmetros de toxicidade relevantes.

Uma das estratégias de avaliação do risco foca-se no agrupamento de resultados adversos comuns. Esta abordagem poderia permitir o uso de biomarcadores de efeito compartilhado (mesmo estes não sendo específicos), uma vez que quando são usados em combinação podem refletir padrões específicos de alterações bioquímicas induzidas por uma mistura de substâncias químicas (Andrade et al., 2015).

Em relação aos biomarcadores de efeito induzido pelas misturas de metais, o seu conhecimento não se encontra tão avançado, mesmo sendo conhecidas as interações

entre metais a diversos níveis biológicos. As interações entre os metais também podem resultar da toxicocinética e processos toxicodinâmicos alterados (Andrade et al., 2015).

4. Interações metal-metal

A preocupação sobre o risco de exposição a misturas de metais, esta a aumentar. Atualmente existe um grande número de combinações possíveis entre metais, quer através de formas farmacêuticas já contendo a própria mistura, quer pela exposição a múltiplas fontes ou pela acumulação dos compostos metálicos no corpo humano ao longo do tempo. Atendendo à situação atual foi necessário criar metodologias para avaliar os riscos provenientes da mistura destes componentes. Diversos métodos para avaliar a toxicidade da junção de compostos foram propostos, desenvolvidos e publicados. Para criar estas metodologias é necessário conhecer a toxicidade de cada metal presente na mistura. A dificuldade de criar estas metodologias baseando-se na toxicologia dos metais recai sobre o facto de alguns metais serem bastante estudados e conhecidos, enquanto outros não. Alguns destes métodos de avaliação foram incluídos nas orientações oficiais de diversas organizações e agências governamentais na avaliação de risco. Atualmente, os estudos sobre as diversas exposições as misturas químicas é muito incompleto.

Em misturas de metais que atuam de forma semelhante, as suas consequências para a saúde humana podem ser calculadas diretamente a partir da soma das doses ou concentrações, através de uma escala de toxicidade relativa. Em misturas de metais que atuam de forma diferente, os seus efeitos podem ser calculados através da resposta de cada componente individualmente (adição da resposta). Estas duas abordagens baseiam-se no pressuposto de que os produtos químicos numa mistura não influenciam a toxicidade uns dos outros. Contudo as misturas químicas raramente são compostas apenas de substâncias semelhantes ou apenas substâncias de ação diferente (EU, 2011).

Das interações entre agentes tóxicos pode resultar um efeito aditivo, sinergismo, potenciação ou antagonismo (Asic & Of, n.d.), (Forum, 2007).

- O efeito aditivo ocorre quando o efeito produzido por dois ou mais agentes tóxicos é igual a soma dos efeitos produzidos individualmente, como mostra a Figura 2, ocorre assim uma mistura de substâncias com toxicidades semelhantes.

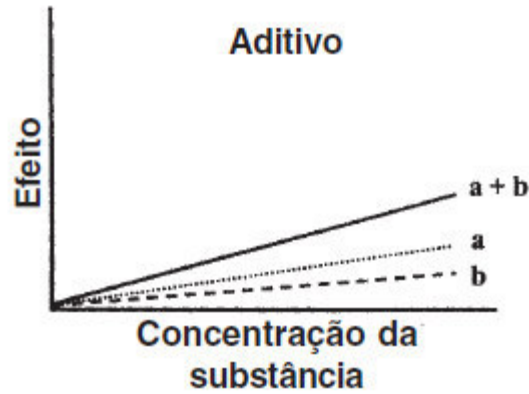


Figura 2- Efeito Aditivo (Organização Mundial da Saúde, 2000)

- O sinergismo é quando o efeito tóxico de dois ou mais agentes resulta num efeito superior ao que podia ser esperado com a soma de compostos semelhantes, como mostra a Figura 3. Este efeito é assim maior que o efeito aditivo.

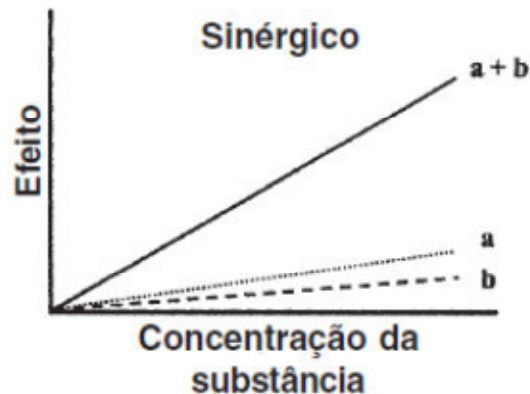


Figura 3- Efeito Sinérgico (Organização Mundial da Saúde, 2000)

- No caso da potenciação o agente tóxico tem o seu efeito aumentado por agir simultaneamente com um agente não tóxico ou com outro tipo de toxicidade.
- O antagonismo é quando o efeito produzido por dois agentes tóxicos se neutraliza ou se reduz, como mostra a figura Figura 4.

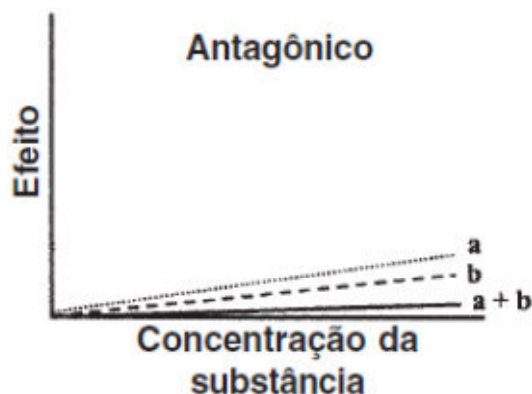


Figura 4- Efeito Antagonista (Organização Mundial da Saúde, 2000)

Estas interações são de elevada relevância na avaliação da exposição e efeitos tóxicos.

As interações entre os metais no organismo humano podem ocorrer quando estes competem pelos locais de ligação enzimática ou pelos recetores específicos (Forum, 2007), (Boobis et al., 2011), (EU, 2011), (Organização Mundial da Saúde, 2000).

O mimetismo molecular ou iónico representa uma outra forma de interação entre metais. Este mecanismo caracteriza-se pela produção de moléculas ou iões semelhantes sob o ponto de vista estrutural, antigénico ou funcional, por parte de microrganismos patogénicos, apresentando determinadas características biomoleculares semelhantes às dos seus organismos hospedeiros. Como exemplo deste mecanismo podemos descrever a substituição de um metal essencial por um metal não essencial (o cádmio pode substituir o zinco ou o cálcio). Alguns metais podem ligar-se à albumina e assim são transportados no sistema circulatório, atravessam as membranas celulares e penetram no interior da célula.

Segundo, (Kamo & Nagai, 2008) existem pesquisas que referem que a toxicidade dos metais ocorre quando iões livres bloqueiam a absorção de iões essenciais, como por exemplo o sódio e o cálcio. Alguns metais como a prata e o cobre bloqueiam a captação de cádmio, chumbo, cobalto, zinco e sódio, enquanto o zinco e o chumbo bloqueiam a captação do cálcio.

Existe um modelo de ligante biótico (BLM) que prevê a toxicidade dos metais. Neste modelo os efeitos dos metais são divididos em categorias. A aditiva, que indica

que o efeito da mistura é a soma dos efeitos tóxicos dos metais. A cumulativa, indica que a razão entre a concentração de um metal num determinado local e a sua concentração tóxica. E mais que aditivo e menos que aditivo. Mais que aditivo refere que dois ou mais metais interagem sinergicamente para aumentar a toxicidade ou seja é a soma simples da toxicidade de cada um dos metais. Menos que aditivo refere que os metais funcionam antagonicamente, ou seja as misturas de metais são menos tóxicas que a soma das toxicidades de cada metal (Kamo & Nagai, 2008).

Existem interações homeostáticas com metais essenciais, essas interações por vezes são complexas, por exemplo o cálcio (Ca) em excesso pode induzir a deficiência em Zn no organismo humano (Kamo & Nagai, 2008). Por outro lado o excesso de Zn pode levar ao déficit de Fe (Badalà, Nouri-mahdavi, & Raoof, 2008).

Dois metais essenciais ou não-essenciais podem competir pelo mesmo sítio de ligação, por transporte passivo ou ativo. Os efeitos resultantes desta ligação podem não ser aditivos, ou seja, um metal pode afetar uma estrutura e o outro metal afetar outra estrutura diferente (Forum, 2007).

5. Legislação em vigor

Sabendo desde já que os fármacos são contaminados com resíduos metálicos durante o processo de fabrico, e sabendo que esses resíduos não trazem qualquer benefício terapêutico ao doente, devem ser criadas orientações para garantir que os riscos do produto farmacêutico não se sobrepõem aos benefícios terapêuticos.

Surgiu então a necessidade de criar diretrizes que definam limites de concentração e métodos validados, para garantir a qualidade dos produtos farmacêuticos, assegurando assim critérios de segurança, e garantindo a qualidade final do produto farmacêutico (EMEA European Medicines Agency, 2008), (Li et al., 2015). Todos estes critérios de qualidade e segurança são impostos e controlados por entidades competentes, como a Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a Conferência internacional sobre Harmonização (ICH), devendo também respeitar as normas das farmacopeias (Li et al., 2015).

5.1. Agência Europeia do Medicamento (EMA)

A EMA elaborou diretrizes com o objetivo de criar limites máximos aceitáveis de concentrações de resíduos metálicos provenientes do processo de fabrico, na síntese de substâncias farmacológicas. Os metais selecionados para esta abordagem, foram escolhidos pelo seu potencial efeito tóxico. Esta lista de metais pode ser alterada ou aumentada sempre que se considere necessário.

Esta classificação divide os metais em três categorias de acordo com a sua segurança e concentração. Os limites máximos de consumo permitidos são calculados de acordo com a dose diária máxima, a duração do tratamento, a forma de administração do medicamento, e exposição diária permitida do resíduo de metal (PDE). Estas recomendações descrevem algumas técnicas analíticas utilizadas para quantificar e classificar estes metais.

A via de administração do fármaco pode influenciar a exposição que o metal tem no organismo, uma vez que a biodisponibilidade oral é limitada para muitos metais, logo as diretrizes descrevem diferentes limites para administração oral e parentérica. Também foram criados limites específicos no caso de inalação de metais.

Os metais são avaliados qualitativamente e quantitativamente quanto ao seu potencial risco para a saúde humana e assim distribuídos em cada uma das seguintes classes, de acordo com o seu nível de perigosidade:

- Classe 1: Metais com graves problemas de segurança (metais que se conheça ou suspeite que tenham um potencial cancerígeno, ou com elevada toxicidade);

- Classe 2: Metais com baixa preocupação de segurança (metais com menos toxicidade para o Homem, geralmente bem tolerados, e que por vezes podem ser encontrados em alimentos ou suplementos nutricionais);

- Classe 3: Metais de preocupação de segurança mínima (metais geralmente bem tolerados até doses bem acima das tipicamente encontradas em fármacos, não apresentam toxicidade significativa, e têm um perfil de segurança bem estabelecido, podendo ser encontrados no meio ambiente).

A Tabela 1 - Limites de exposição e concentração, em reagentes e catalisadores metálicos. Adaptada de (EMEA European Medicines Agency, 2008) dá-nos informação sobre exposição máxima diária aceitável (PDE) e os limites de resíduos metálicos aceitáveis, pelas diferentes vias de introdução no organismo (oral, parentérica ou inalatória).

Os metais que estão descritos na classe 1 são subdivididos em três subclasses, classe 1A, classe 1B e classe 1C.

Tabela 1 - Limites de exposição e concentração, em reagentes e catalisadores metálicos. Adaptada de (EMEA European Medicines Agency, 2008)

	Classificação	Exposição Oral		Exposição parentérica		Inalação
		PDE (µg/dia)	Concentração (ppm)	PDE (µg/dia)	Concentração (ppm)	PDE (µg/dia)
Metais com graves problemas de segurança	Classe 1A: Pt, Pd	100	10	10	1	Pt: 70
	Classe 1B: Ir, Rh, Ru, Os	100	10	10	1	
	Classe 1C: Mo, Ni, Cr, V	250	25	25	2,5	Ni: 100 Cr (VI): 10
Metais com baixa preocupação de segurança	Classe 2: Cu, Mn	2500	250	250	25	
Metais com preocupação de segurança mínima	Classe 3: Fe, Zn Metais com preocupação de segurança mínima	1300	1300	1300	130	

Existem duas opções para calcular os limites de metais:

Opção 1: Os limites de concentração de metais (ppm) da Tabela 1 foram calculados utilizando a equação:

$$\text{Concentração (ppm)} = \frac{\text{PDE (}\mu\text{g/dia)}}{\text{dose diária (g/dia)}}$$

Se todas as substâncias farmacêuticas contidas num medicamento respeitarem os limites de concentrações da opção 1, podem ser utilizadas em qualquer proporção no medicamento, desde que a dose diária não exceda 10 g por dia. Quando a dose diária ultrapassa as 10 g por dia deve ser utilizada a opção 2.

Opção 2A: A PDE pode ser usada simultaneamente com a dose diária efetiva da substância farmacêutica, para calcular a concentração de resíduos metálicos permitidos nessa substância farmacêutica.

Opção 2B: Utiliza a dose diária máxima conhecida do medicamento, para determinar a concentração de um resíduo de metal proveniente de qualquer uma das substâncias presentes no medicamento.

Pode utilizar-se esta opção desde que exista a evidência que os resíduos de metal foram reduzidos ao mínimo para todas as substâncias. Por conseguinte os níveis máximos de um metal podem ser mais elevados que nas opções 1 ou 2A, mas devem ser compensados pela diminuição dos níveis de outras substâncias contidas no mesmo fármaco (EMA European Medicines Agency, 2008).

5.2. Conferência internacional sobre Harmonização (ICH)

Tal como na EMA, também na ICH foram elaboradas diretrizes onde ficaram definidos os limites da PDE para os metais, potencialmente tóxicos. Nesta orientação os valores da PDE estabelecidos são considerados limites de proteção para a saúde pública, em todos os grupos de doentes.

Para avaliar e controlar as impurezas que possam estar contidas nos medicamentos, existem processos de gestão de riscos. Neste pressuposto o processo de avaliação pode ser descrito em 4 etapas: Identificar, analisar, avaliar e controlar.

- Identificar: identificar a possível origem de contaminação do medicamento;
- Analisar: determinar a probabilidade de um certo metal estar contido no medicamento;

- Avaliar: comparar os níveis de impurezas contidos no produto com o valor da PDE estabelecido;
- Controlar: regulamentar e implementar estratégias para controlar as impurezas metálicas no medicamento.

O valor da PDE pode ser atualizado sempre que se achar necessário, uma vez que podem surgir novos dados de segurança. Esta diretriz pode ser alterada para incluir novos metais ou outras vias de administração. Nesta orientação só estão definidos valores da PDE para as vias de administração orais, parentérica e inalatória.

Em alguns casos podem ser aceites níveis de metais superiores, ao que esta descrito na PDE. Alguns desses casos são, dosagem menor que a dosagem diária máxima, exposição ao fármaco num curto espaço de tempo, ou indicações específicas (doenças raras).

A ICH tal como a EMA também dividiu os metais em classes Tabela 2 - Classificação de impurezas metálicas (ICH, 2013), de acordo com o seu nível de risco:

- **Classe 1:** Nesta classe são significativamente tóxicos em todas as vias de administração;
- **Classe 2:** Nesta classe os metais são mais ou menos tóxicos de acordo com a via de administração;
- **Classe 2A:** Nesta classe todos os elementos são igualmente tóxicos independentemente das vias de administração;
- **Classe 2B:** Nesta classe os metais são avaliados, somente se forem adicionados ao processo de fabrico;
- **Classe 3:** Nesta classe os elementos apresentam uma toxicidade relativamente baixa no caso de administração oral, mas necessitam de uma vigilância mais apertada no caso de outras vias de administração (parentérica, inalação);
- **Classe 4:** Nesta classe estão incluídas substancias que foram avaliadas, mas para as quais não foi estabelecido um valor da PDE, devido a sua baixa toxicidade.

Tabela 2 - Classificação de impurezas metálicas (ICH, 2013)

	Impurezas metálicas	Incluir na Avaliação de Risco?
Classe 1	As, Pb, Cd, Hg	Sim
Classe 2^a	V, Mo, Se, Co	Sim
Classe 2B	Ag, Au, Ti, Pd, Pt, Ir, Os, Rh, Ru	Sim, se adicionado intencionalmente
Classe 3	Sb, Ba, Li, Cr, Cu, Sn, Ni	Depende da via de administração
Classe 4	B, Fe, Zn, K, Ca, Na, Mn, Mg, W, Al	Não

Os limites de concentração de metais permitidos nesta orientação são calculados recorrendo as seguintes opções:

- **Opção 1:** Esta opção parte do pressuposto que a ingestão diária do medicamento é no máximo de 10 gramas. Esta opção não se baseia no facto das impurezas presentes apresentarem todas na mesma concentração. A equação abaixo de uma forma simplificada calcula para cada elemento, a concentração máxima admissível;

$$\text{Concentração } (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{PDE } (\mu\text{g/dia})}{\text{quantidade diária de medicamento (g/dia)}}$$

- **Opção 2A:** Esta opção é idêntica a opção 1, apenas diferem porque nesta opção a dose diária máxima de medicamento não é 10 gramas, mas sim a dose diária máxima real. A equação utilizada para calcular a concentração máxima de cada elemento é a mesma utilizada na opção 1;
- **Opção 2B:** Nesta opção inicialmente identificam-se os produtos potencialmente presentes. A massa total de impurezas presente no fármaco pode ser calculada como a soma dos produtos que compõem o fármaco nas concentrações máximas estabelecidas pelo requerente. A massa total do fármaco não pode exceder os valores da PDE tabelados. Esta abordagem

permite que a concentração máxima permitida para um determinado componente possa ser maior que o limite estabelecido, tendo de ser compensado com menores concentrações de outros componentes. Como descreve a equação:

$$\text{PDE}(\mu\text{g}/\text{dia}) \geq \sum_{K=1}^N C_K \cdot M_K$$

- K = um índice para cada N componentes do fármaco;
- C_K = concentração de impurezas no componente K ($\mu\text{g}/\text{dia}$);
- M_K = massa do componente K na dose máxima diária do fármaco (g).

- **Opção 3:** A concentração de cada componente é medida no fármaco acabado. A equação utilizada para calcular a concentração máxima permitida de impurezas, é a mesma utilizada na opção 1. Utiliza-se a dose diária total máxima do fármaco.

Esta avaliação deveria demonstrar que o nível de impurezas está abaixo dos limites máximos estabelecidos (ICH, 2013).

5.3. Farmacopeias

Todas as farmacopeias dispõem de um teste para metais, que geralmente é baseado na precipitação de sulfetos em meio aquoso. É um teste semi-quantitativo visual. Apresenta sérias limitações, falta de sensibilidade e especificidade, para avaliar adequadamente os níveis reais de metais de acordo com a Agência Europeia dos Medicamentos (EMA European Medicines Agency, 2008).

Atualmente têm sido reunidos esforços por parte das entidades reguladoras, para o desenvolvimento de novos métodos e técnicas, para controlar as impurezas metálicas contidas nos fármacos (Font & Buendi, 2009).

- **Farmacopeia dos Estados Unidos (USP)**

A USP está a alterar os limites de elementos químicos considerados impurezas elementares, bem como os seus métodos de análise. Tem como objetivo proteger a saúde pública estabelecendo métodos e limites aceitáveis de impurezas em medicamentos.

O método descrito no capítulo 231 da USP para a determinação dos elementos químicos baseia-se em métodos de precipitação com sulfeto em solução aquosa e comparação visual da cor com solução padrão (Nageswara Rao & Kumar Talluri, 2007). Este método apresenta diversas limitações, consome demasiado tempo, apresenta baixa sensibilidade e especificidade e por vezes não deteta a presença de substância extremamente importantes tais como As, Cd, Hg e Pb (EMA European Medicines Agency, 2008).

O capítulo 232 especifica os limites para algumas impurezas químicas em medicamentos (Technique, 2013).

O capítulo 233 descreve dois procedimentos analíticos para a determinação dos níveis de impurezas. Métodos mais sensíveis e específicos do que os anteriormente utilizados. O método 1 sugere o uso de espectrometria de emissão atómica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES), e o método 2 o uso de espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) (The United States Pharmacopoeial Convention, 2013).

Os parâmetros de validação para a aceitação do método são: seletividade, especificidade, precisão, exatidão e repetibilidade (EMA European Medicines Agency, 2008).

- **Farmacopeia Europeia (PE)**

O capítulo 5.20 “Catálise metálica ou resíduos de reagentes metálicos”, da Farmacopeia Europeia, neste momento encontra-se em atualizações. Atualmente é uma reprodução literal da diretiva da EMA, e será substituído, até dezembro 2017, por uma cópia da diretiva ICH Q3D. O capítulo revisto será publicado no suplemento 9.3 da PE. A data de implementação será 1 de janeiro de 2018.

O suplemento 9.3 da PE vai conter uma referência cruzada ao capítulo 5.20 revisto.

A monografia geral das preparações farmacêuticas (2619) passará a tornar a aplicação das normas ICH Q3D obrigatórias para todos os medicamentos.

O capítulo 2.4.20. “Determinação de catalisador metálico e resíduos de reagentes metálicos”, dispõe de orientação adicional para o desenvolvimento de procedimentos, como preparação de amostras e validação de métodos (Division, 2016), (Pharmacopeia, 2013).

5.4. Aplicabilidade da legislação em vigor

As normas definidas pelas diferentes autoridades da União Europeia e dos Estados Unidos não são totalmente sobreponíveis no que se refere à lista de elementos, limites estabelecidos e as datas de implementação.

A Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a Farmacopeia Europeia (PE), definem limites para 14 elementos metálicos (Cu, Fe, Ir, Cr, Mo, Mn, Os, Ni, Pd, Pb, Pt, Rh, Ru, V e Zn), normas estas aplicadas aos novos medicamentos submetidos à aprovação na Europa a partir de junho de 2016 e aos produtos existentes em dezembro de 2017.

Por outro lado a Farmacopeia dos Estados Unidos (USP), define limites para 15 elementos (As, Cr, Cd, Cu, Ir, Hg, Mo, Ni, Os, Pd, Pb, Pt, Rh, Ru, V), estes limites serão implementados a partir de janeiro de 2018 (Figueiredo et al., 2016), (EMEA European Medicines Agency, 2008), (The United States Pharmacopeial Convention, 2013),(Pharmacopeia, 2013).

6. Toxicidade de metais

Os organismos vivos são afetados pelos metais, dependendo da forma química e da dose. Os metais são necessários para muitas das funções vitais do organismo humano. A ausência ou a diminuição de alguns deles pode levar a efeitos adversos, sendo que défices nutricionais destes metais podem aumentar a vulnerabilidade dos seres humanos. Mas por outro lado quando se encontram em excesso no organismo humano todos podem causar toxicidade, ou seja, podem provocar efeitos adversos sobre os organismos vivos. Mesmo os metais considerados essenciais para o organismo humano, podem em determinadas situações ser extremamente tóxicos (Andrade et al., 2015), (Mohamed et al., 2016), (Izah et al., 2016).

A toxicidade depende do grau de exposição do metal no organismo. A exposição está relacionada tanto com a quantidade como com o tempo de exposição ao metal, ou seja, quanto mais quantidade da substância química e maior o tempo de exposição no organismo, maior será a resposta tóxica.

A concentração do metal no organismo é proporcional à dose, mas doses iguais de diferentes metais podem levar a diferentes concentrações nos órgãos alvo, logo a toxicidades diferentes. Se o metal for pouco absorvido, pode nunca atingir uma concentração que provoque toxicidade. A distribuição de produtos tóxicos pode ser muito ampla e não ter uma concentração significativa no órgão alvo, assim a toxicidade é menor. A bio transformação é outro fator que está relacionado com a toxicidade do metal, uma vez que através dela os produtos químicos podem formar metabolitos mais ou menos tóxicos. Quanto à excreção do produto químico, quanto mais rápido ocorrer menor será a sua concentração, logo menor a sua toxicidade (Asic & Of, n.d.).

Os efeitos tóxicos dos metais são determinados pela capacidade dos metais se convertem numa forma bio disponível. Existe evidências de alguns efeitos tóxicos no organismo, provocados por metais conhecidos (Forum, 2007).

Para avaliar os riscos, são selecionados efeitos adversos que servem como base para calcular valores e limiares de toxicidade de referência. O mecanismo de toxicidade e o efeito adverso podem variar de acordo com a forma do metal.

As exposições de elevadas concentrações a curto prazo podem dar origem a síndromes de toxicidade aguda, geralmente envolve o trato gastrointestinal, e sequencialmente os sistemas renal, cardiovascular, nervoso e hematopoiético.

Normalmente quando a dose do metal é muito elevada ocorrem efeitos adversos em diversos órgãos, por vezes com sequelas a longo prazo.

Exposições que ocorrem por períodos prolongados geralmente causam acumulação em órgãos-alvo ao longo do tempo. Estas exposições podem envolver qualquer sistema ou órgão mas não costumam produzir sintomas gastrointestinais evidentes. Por exemplo a exposição num período longo de tempo ao Cd pode levar a acumulação deste metal em órgãos-alvo como o rim, mas não produzirá efeitos clínicos óbvios até a acumulação ser em excesso, ou seja, levar a deficiente função renal e consequentemente ao aparecimento da doença renal ou osteoporose (Forum, 2007).

Hoje em dia, já é possível antever consequências a médio e a longo prazo. Por vezes, esses efeitos perdem a especificidade, pois podem ser provocados por outras substâncias tóxicas ou por interação entre metais (Calderón et al., 2003).

6.1. Arsénio (As)

O arsénio é um metal muito abundante no meio ambiente, não sendo contudo essencial ao ser humano. Este metal pode ser encontrado no ar, água, solo ou alimentos. É utilizado em medicina, na agricultura e na atividade mineira (Félix, 2007), (Shrestha, Lama, Joshi, & Sillanpää, 2008), (Wu et al., 2016), (Organização Mundial da Saúde, 2000). Pode ser usado como desodorizante, branqueador e na produção de vidro. Pode ser encontrado em inseticidas, herbicidas e medicamentos. Em pequenas doses tem uma ação vasodilatadora (De Capitani, De, & Resumo, 2009).

As principais vias de entrada deste metal no organismo humano são a ingestão ou inalação. Acumula-se essencialmente nos pulmões, sistema hepático e renal. É excretado pela urina.

O grau de toxicidade do arsénio depende da forma do composto (inorgânico ou orgânico) e do estado de oxidação do elemento. Os compostos inorgânicos são considerados mais tóxicos do que os orgânicos (Wu et al., 2016), (Félix, 2007), (Andrade et al., 2015).

Os problemas de saúde produzidos pelo metal dependem da dose, da frequência e do tempo de absorção. A intoxicação aguda com este metal pode apresentar dores abdominais, náuseas, vômitos, vertigens, diarreia, obstipação, desidratação, fraqueza e vermelhidão da pele. A exposição crónica está muitas vezes relacionada com o uso prolongado de medicamentos, e pode provocar alterações no sistema cardiovascular, tais

como vasodilatação, necrose das extremidades e lesões no miocárdio. Ao nível dérmico pode provocar hiperqueratose arsenical que ocorre nas palmas das mãos e plantas dos pés, estas lesões a longo prazo podem conduzir ao aparecimento de lesões de carácter oncológico. A nível das mucosas pode provocar querato-conjuntivite. As manifestações neurológicas caracterizam-se por nevrite periférica, parestesias e fraqueza muscular. No fígado pode levar a lesões degenerativas do parênquima hepático, cirrose e carcinoma hepático. No sistema nervoso periférico conduz a neuropatia, as lesões no sistema nervoso central podem conduzir a alterações mentais diversas tais como atraso mental e epilepsia. O excesso deste metal pode levar também a casos de diabetes (Félix, 2007), (Wu et al., 2016).

6.2. Cádmió (Cd)

O cádmio é um metal pesado não essencial ao organismo humano, altamente tóxico e de difícil biodegradação ambiental. Este metal é um dos principais contaminantes ambientais com graves consequências toxicológicas a nível mundial (Liu et al., 2015), (Félix, 2007), (History, 2010), (Odewumi et al., 2015).

É abundantemente absorvido pelas plantas, (Félix, 2007), (History, 2010), (Odewumi et al., 2015) e pelo organismo humano através da via respiratória e gastrointestinal. Uma das principais fontes de exposição a este metal é o tabagismo (Olszowski et al., 2015). A absorção deste metal é potenciada por uma dieta pobre em cálcio, ferro e proteínas. É eliminado preferencialmente pela urina (Félix, 2007), (History, 2010), (Odewumi et al., 2015).

O cádmio é um metal pesado que não apresenta funções no corpo humano, mas produz efeitos tóxicos, mesmo em concentrações muito pequenas, devido à sua baixa excreção.

A toxicidade deste metal surge da sua interação com sistema biológico. O Cd é um metal muito reativo que se complexa com diversos ligandos e forma compostos diferentes, que afetam diferentes moléculas e órgãos. Este metal pode acumular-se na maioria dos órgãos, mas deposita-se principalmente nos pulmões, fígado e rins levando ao mau funcionamento e até mesmo a destruição destes órgãos. Para além dos danos nos órgãos este metal leva também a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA) celular (Wu et al., 2016), (History, 2010), (Odewumi et al., 2015), (Olszowski et al., 2015).

Uma vez que se trata de um metal não essencial para o organismo humano este metal é classificado com teratogénico, carcinogénico e mutagénico (History, 2010).

Na exposição crónica ao metal os dentes podem ficar pigmentados de amarelo devido a deposição no esmalte. Ocorrem alterações da função renal como glicosúria, aminaciúria e proteinúria. Afeta também o sistema respiratório com a diminuição do olfato, renite, bronquite crónica, fibrose intersticial e enfisema pulmonar. Pode ocorrer excitação psicomotora, irritabilidade, défice de memória, insónia, dificuldade de concentração, fadiga, anorexia, fraqueza muscular, arteriosclerose, perturbações do discurso, diminuição da libido, alucinações, delírios e comportamento compulsivo. Pode afetar os rins, pulmões, fígado e os ossos. É muito carcinogénico. As crianças e os idosos são os grupos que apresentam maiores riscos aquando da exposição a este metal (Félix, 2007).

Alguns estudos referem que este metal está implicado no aumento das doenças cardiovasculares. Outros relatam que o cádmio possa ser um possível fator etiológico para doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer e Parkinson (Olszowski et al., 2015).

6.3. Chumbo (Pb)

O chumbo é um metal cinza-azulado, encontra-se em pequenas quantidades na crosta terrestre. Este metal pode ser usado na indústria automóvel, química, revestimento de cabos, baterias elétricas, esmaltes e tintas, vidros, borrachas, canos, cerâmica e joias (Félix, 2007), (Wu et al., 2016), (Andrade et al., 2015).

O chumbo é absorvido pelo organismo principalmente por ingestão. A absorção de chumbo pela via digestiva pode ser influenciada por fatores relacionados com a alimentação, como o estado de jejum, a ingestão de proteínas e a presença de cálcio, ferro e fósforo. Quando ocorre deficiência destes nutrientes aumenta a absorção de chumbo (Rocha, 2009), (Wu et al., 2016).

O chumbo é um elemento tóxico não essencial que se acumula no organismo humano. Este metal afeta todos os órgãos e sistemas do organismo. O chumbo depois de absorvido, distribui-se no plasma e nos fluidos extracelulares. Estima-se que noventa e cinco por cento do chumbo é transportado no organismo dos humanos ligando-se à hemoglobina nos glóbulos vermelhos, podendo até atravessar a barreira hemato-

encefálica. Acumula-se nos tecidos moles e nos ossos. A excreção dá-se por diversas vias, sendo de realçar a via renal e gastrointestinal (Félix, 2007), (Rocha, 2009), (Tavares, Tania M. ; Carvalho, 1992).

A intoxicação pelo chumbo pode provocar fraqueza, irritabilidade, astenia, náuseas e anemia. As crianças são mais afetadas pela toxicidade ao chumbo que os adultos, nelas este metal pode provocar atraso físico e mental, perda de concentração e diminuição da capacidade cognitiva (Félix, 2007), (De Capitani et al., 2009), (Heinze, Gross, Stehle, & Dillon, 1998), (Tavares, Tania M. ; Carvalho, 1992), (Smith, Bayer, & Strupp, 1998), (Rieuwert, Farago, Cikrt, & Bencko, 2000), (Organização Mundial da Saúde, 2000).

O sistema mais prejudicado por este metal é o sistema nervoso. Afeta o sangue, rins, sistema digestivo e reprodutor, causa hipertensão e é teratogénico. Na intoxicação aguda surgem sintomas como sede intensa, sabor metálico na boca, inflamação gastrointestinal, vômitos e diarreias (Rocha, 2009), (Félix, 2007), (Heinze et al., 1998). A exposição a este metal por longos períodos de tempo tem sido associada a um risco de cancro na bexiga, estômago e rim (Wu et al., 2016).

6.4. Ferro (Fe)

O ferro é um elemento essencial. A deficiência deste metal no organismo humano provoca anemia. A nível do corpo humano, ele tem como principal função transportar oxigénio no sangue. Apesar de ser um elemento essencial a vida e ao desenvolvimento celular pode torna-se tóxico para o organismo, em casos de intolerância ao metal, deficiência genética ou por ingestão excessiva. Os níveis tóxicos de ferro são associados a doenças neurológicas, incluindo a doença de Parkinson (Félix, 2007), (Badalà et al., 2008).

6.5. Zinco (Zn)

O zinco é encontrado na crosta terrestre. Este elemento é utilizado na indústria automóvel, eletrodomésticos e construção civil. Também é usado para o fabrico de ligas resistentes à corrosão. Alguns compostos de zinco são utilizados na indústria de cerâmica, tintas, borracha, têxtil, enriquecimento de solos pobres em zinco e para

preservar madeiras. Na indústria farmacêutica utiliza-se para o fabrico de protetores solares, desodorizantes, tratamento de micoses, acne e champôs anti caspa.

O zinco é essencial ao normal funcionamento do sistema imunitário. No desenvolvimento de crianças, quando a sua quantidade esta diminuída no organismo pode ocorrer, atrofia tímica, linfopenia, diminuição das mitoses e diminuição de imunoglobulina. Na deficiência em zinco ocorrem danos no trato gastro intestinal e pulmonar, aumentando assim a probabilidade de ocorrerem infeções.

A toxicidade aguda a este metal pode apresentar sintomas, tais como, desidratação, letargia, vertigens, dores abdominais, náuseas, vômitos e descoordenação muscular. Longos períodos sujeitos a doses elevadas de zinco, podem interferir com a absorção de cobre. Muitos dos efeitos tóxicos do zinco, são na realidade devidos à deficiência em cobre. Elevados níveis do metal no organismo podem levar ao aparecimento de carcinogénese (Prasad, 1979).

6.6. Vonádio (V)

O vonádio é um metal de cor acinzentada. É amplamente encontrado na natureza. Este metal é considerado mais toxico quando administrado parentericamente. É um dos principais metais utilizados como combustível fóssil. É um metal essencial. Suplementos a base de sulfato de vonádio, são comercializados para normalizar os índices de glicose no sangue e promover o crescimento muscular. Concentra-se principalmente no fígado, pulmões e rins. Pode entrar no organismo por ingestão ou inalação.

Não estão associados efeitos adversos a curto prazo. Pode ser responsável por doenças neurológicas e cardiovasculares. As pessoas que sofrem intoxicação por este composto desenvolvem os seguintes sintomas: dor de cabeça, tremores nas mãos, hipertensão, língua verde, tosse, palpitações, respiração ofegante, irritação dos ouvidos e garganta (EMEA European Medicines Agency, 2008).

6.7. Platina (Pt)

A platina é um metal de cor branca acinzentada. Pertence ao grupo dos platinoides. A absorção oral de sais de Pt é muito baixa (<5% da dose oral). É excretado principalmente através das fezes.

Este metal é muito utilizado como catalisador na indústria farmacêutica, é também utilizado em joias e odontologia. A cisplatina e a carboplatina são muito utilizadas em tratamentos de quimioterapia na doença oncológica (EMEA European Medicines Agency, 2008), (Alves, F.E.; Silva, P.P; Guerra, 2010). A cisplatina apresenta citotoxicidade, mielotoxicidade, nefrotoxicidade e ototoxicidade (EMEA European Medicines Agency, 2008).

6.8. Paládio (Pd)

O paládio é um metal que possui uma coloração branco prateado. É um metal semelhante à platina e ao níquel. Este metal é pouco reativo e muito resistente à corrosão. A sua ocorrência na crosta terrestre é muito baixa (EMEA European Medicines Agency, 2008), (Alves, F.E.; Silva, P.P; Guerra, 2010). É muito utilizado em odontologia. É encontrado com alguma frequência em alimentos, tais como leite, aves, mel, entre outros. É eliminado nas fezes e na urina.

Por via oral o paládio é fracamente absorvido. Normalmente acumula-se no rim, fígado, baço, nódulos linfáticos, glândulas supra-renais, pulmão e ossos. Este metal pode causar ao nível oftálmico irritação, dermatite de contacto, estomatite, mucosite, febre, hemólise, descoloração ou necrose da pele no local de aplicação (EMEA European Medicines Agency, 2008).

6.9. Níquel (Ni)

O níquel é um metal prateado. Este metal possui diferentes estados de oxidação. É um metal de transição que é essencial a nível nutricional. (Félix, 2007), (Allan, 1997) É eliminado pela urina (Félix, 2007). Este elemento é utilizado na produção de aço inoxidável, por ser muito resistente a ação corrosiva. É usado como catalisador em

reações de hidrogenação, produção de margarina e manteiga. Está presente na produção de baterias alcalinas, moedas, pigmentos inorgânicos, próteses clínicas e dentárias.

Nos humanos o níquel interfere na absorção e no metabolismo do ferro, e é um componente imprescindível no processo de hematopoiese (Allan, 1997). Este composto é um elemento essencial, envolvido na atividade enzimática, hormonal, estabilidade estrutural das macromoléculas biológicas e no metabolismo em geral. A carência de níquel no organismo pode alterar o metabolismo da glicose e assim diminuir a sua tolerância. Este composto geralmente entra no organismo por ingestão, inalação, mas também pode entrar por via dérmica. A excreção deste metal é por via urinária.

A toxicidade a este composto provoca cefaleias, náuseas, vômitos, apatia, diarreia, febre e afeções da pele. O níquel em elevadas concentrações pode ser considerado um veneno forte, podendo levar a carcinomas a nível das fossas nasais e vias respiratórias inferiores (Félix, 2007).

6.10. Manganês (Mn)

O manganês é muito importante para o crescimento das plantas. É um elemento essencial para o ser humano, uma vez que faz parte de um conjunto de oligoelementos necessários à atividade enzimática. O homem necessita de 4 mg/dia deste elemento. A intoxicação por este metal pode ocorrer por ingestão ou inalação. A principal via de entrada do manganês no organismo é o trato respiratório. O metal também pode ser absorvido ao longo do intestino quando ingerido por via oral.

Quando se encontra no organismo humano em concentrações muito elevadas pode provocar toxicidade, em diversos níveis tais como sistema reprodutor, cardíaco, respiratório, sendo o mais preocupante a nível do sistema nervoso central, as manifestações do tóxico neste sistema são em parte, semelhantes às manifestações da doença de Parkinson. Este tóxico acumula-se maioritariamente no fígado, mas pode ser encontrado também no rim e no cérebro. Não existem evidências que este metal seja carcinogénico. É eliminado por via biliar e fecal (Félix, 2007), (Andrade et al., 2015).

6.11. Cobre (Cu)

O cobre é um metal nobre, e é essencial ao organismo humano, a sua ausência no organismo pode causar anemia (Badalà et al., 2008), (Félix, 2007). Pode ser usado na composição química de fungicidas, utiliza-se também como emético e anti-helmintico. O cobre pode ser absorvido por via inalatória, oral ou dérmica. A intoxicação aguda ao metal pode levar a dores abdominais, náuseas, vômitos, sabor metálico e descoloração da pele e cabelos.

Já a exposição crônica leva à coloração esverdeada dos tegumentos, cabelos e dentes. Por vezes provoca dermatites e altera a mucosa nasal. A nível oftalmológico o cobre pode ser o responsável pelo aparecimento de cataratas. A longa exposição ao cobre causa a doença de Wilson, que se trata de um distúrbio genético causado pela acumulação de cobre nos tecidos. Pode causar cirrose, anemia e alterações neurológicas (Félix, 2007).

6.12. Crómio (Cr)

O crómio é um metal acinzentado, muito resistente à corrosão. A forma metálica não é encontrada livre na natureza, é obtida pelo processamento industrial do minério de crómio. Este metal é amplamente utilizado na construção civil, uma vez que é resistente à oxidação, ao desgaste e ao atrito. A nível industrial é utilizado em diversas áreas, tais como tratamento de couro, produção de tintas e pigmentos, pode ser também utilizado para preservar madeiras.

O crómio é essencial a nutrição humana, apesar de ter um potencial efeito cancerígeno. Serve como fator de tolerância à glicose. É usado como co-fator no mecanismo de ação da insulina. Pode ser absorvido pela via inalatória e gastrointestinal. É excretado pela urina. Após 20 anos de exposição ainda pode ser detetado nos cabelos, sangue e urina. A toxicidade do crómio depende do seu estado de oxidação.

A exposição aguda ao metal pode provocar a inflamação do tubo digestivo seguida de necrose, podendo mesmo causar a morte.

A exposição crónica pode causar dermatites, úlceras crónicas indolores, dentes e língua amarelados, irritação das mucosas (principalmente nasal), alergias respiratórias e pode provocar cancro ao nível do sistema respiratório (Félix, 2007).

6.13. Mercúrio (Hg)

O mercúrio é uma substância que está presente no meio ambiente. Este metal entra no organismo por ingestão ou inalação. É um metal pesado e existe na forma orgânica, inorgânica e elementar. Quando está sob a forma de vapor, é absorvido pelas vias respiratórias em 80%. Devido à sua lipossolubilidade é rapidamente absorvido pelo sistema nervoso central, sendo muito tóxico para as células. Este metal sofre transformações metabólicas no organismo humano, por mecanismos de oxi-redução. Os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção dependem da forma e do estado de oxidação do metal. O mercúrio é excretado principalmente através das fezes e da urina.

Um dos primeiros sinais de intoxicação por este metal é o tremor, que resulta do facto do metal ter atingido o SNC, iniciando-se nas extremidades, afetando depois a língua, pálpebras e lábios progressivamente. Sintomas tais como perturbações na escrita (disgrafismo), sabor metálico na boca, queda de dentes, dificuldades na marcha, irritabilidade, alucinações e depressão são frequentes.

O Hg pode afetar todos os órgãos causando danos por toxicidade, podendo ocorrer dores abdominais e diarreia sanguinolenta, insuficiência renal, insuficiência cardio-respiratória e morte.

As crianças são um potencial alvo deste metal. O Hg atravessa facilmente a barreira placentária, e também pode chegar ao bebé através do leite materno. Provoca desorientação mental, atraso no desenvolvimento geral, descoordenação motora, cegueira, alterações da fala e alterações ao nível renal (Félix, 2007), (Wu et al., 2016).

7. Métodos e técnicas para a qualificação e quantificação dos metais presentes nos fármacos

Atualmente existe uma necessidade de conhecer e quantificar os metais contidos nos fármacos, para tentar minimizar os prejuízos que eles podem trazer para o organismo humano.

Para a determinação de cada resíduo de metal deve haver um método adequado e validado. O teste deve ser específico para cada elemento. Pode ser utilizado um método mais geral que detete um ou mais metais com um limite de concentrações apropriado, caso se comprove que nenhum dos metais referidos ultrapassa os limites aceitáveis.

Segundo a EMA se o fármaco na sua composição apenas tiver resíduos metálicos de classe 2 ou classe 3 pode ser utilizado um método não específico.

Os procedimentos analíticos devem ser os da farmacopeia ou procedimentos alternativos adequados e validados (EMEA European Medicines Agency, 2008), (ICH, 2013), (Gomez et al., 2004), (Font & Buendi, 2009), (Fischer et al., 2014).

Diferentes técnicas analíticas tais como titulação, espectrofotometria, técnicas espectroscópicas e cromatográficas são usadas, para a caracterização e avaliação de impurezas metálicas tais como a cromatografia de ultra performance líquida (UPLC), espectrometria líquida de cromatografia de massa (LC-MS), espectrometria de massa de alta resolução (HRMS), cromatografia gasosa – espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia de camada fina de alto rendimento (HPTLC), espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de fluorescência de raio-X (XRF) (Ramachandra, 2016), (Figueiredo et al., 2016).

- A cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) é uma das técnicas mais utilizadas, esta técnica não destrói a amostra e pode ser aplicada a compostos termicamente suscetíveis.
- A cromatografia líquida de fase reversa (RPLC) também é muito utilizada pois apresenta uma ampla seletividade, reprodutibilidade e compatibilidade com as amostras farmacêuticas.
- A cromatografia líquida de ultra performance (UPLC) tem sido usada em substituição de técnicas de HPLC. UPLC tem uma eficiência semelhante à HPLC, mas pode ser utilizada a pressões muito mais elevadas e a

sensibilidade da detecção da UPLC é duas a três vezes superior à detecção por HPLC. Outras vantagens da UPLC relativamente à HPLC, é mais rápida, existe redução do uso de solventes e diminuição dos custos (Ramachandra, 2016), (Holm & Elder, 2016).

- A espectrometria líquida de cromatografia de massa (LC-MS) é muito útil para a identificação e caracterização estrutural de moléculas orgânicas (Ramachandra, 2016), (Narayanam et al., 2014).
- A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) é cada vez mais utilizada. Esta técnica fornece informação relacionada com o peso molecular, composição e estrutura da molécula (Vessecchi, Galembeck, Lopes, Nascimento, & Crotti, 2008), (Ramachandra, 2016).
- A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) é um método analítico utilizado para separar compostos voláteis e semi-voláteis, solventes residuais e compostos termicamente estáveis. A principal vantagem que esta técnica apresenta é que os espectros de massa apresentam padrões específicos correspondentes aos compostos a analisar.
- A cromatografia em camada fina de alta resolução (HPTLC) é uma adaptação atualizada da TLC, e é o único método cromatográfico que tem a opção de apresentar os resultados como uma imagem. Tem como vantagens ser simples, a análise das amostras poder ser paralela, apresentar baixos custos, os resultados serem obtidos rapidamente e ter capacidade para detetar diferentes componentes.
- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR), é uma técnica de pesquisa que analisa as propriedades magnéticas de núcleos atômicos para determinar propriedades físicas e químicas de moléculas onde estão contidos. Baseia-se no fenómeno da ressonância magnética nuclear, e dá-nos informações detalhadas sobre a estrutura, dinâmica, estado de reação e ambiente químico das moléculas (Ramachandra, 2016), (Holm & Elder, 2016).
- Espectrometria de fluorescência de raio-X (XRF) é uma técnica não destrutiva que permite identificar os constituintes de uma amostra (líquidos, sólidos ou pós) qualitativa e quantitativamente, com a vantagem de uma fácil preparação da amostra. Nesta técnica uma fonte de radiação de elevada energia provoca a excitação dos átomos da substância a analisar.

A espectrometria de fluorescência de raio-X por dispersão de comprimento de onda (WDXRF) é reconhecida pela sua linearidade, sensibilidade, precisão e exatidão (Gonçalves et al., 2011), (Font & Buendi, 2009), (Figueiredo et al., 2016).

Para monitorizar a toxicidade dos metais e avaliar os riscos para a saúde, tem sido muito utilizado o cabelo humano na biomonitorização. Através desta avaliação consegue estimar se os níveis de exposição ambiental e avaliar o estado nutricional.

O cabelo humano apresenta diversas vantagens sobre outros tecidos uma vez que a recolha da amostra é menos invasiva, mais fácil transportar e armazenar, e menos perigosa para manipular (Zhuang, Lu, Li, Zou, & McBride, 2014).

8. Consequências para a saúde da associação dos metais

O facto de os metais apresentarem uma potencial toxicidade, aliado ao facto das suas características permitirem que estes se acumulem no organismo humano com facilidade, pode comprometer a saúde pública (Chanpiwat, Lee, Kim, & Sthiannopkao, 2014).

Os organismos vivos estão expostos a múltiplos xenobióticos, como por exemplo os metais. Existem múltiplos estudos que referem efeitos para a saúde resultantes da exposição a um único metal, em contrapartida não existe muita informação sobre os efeitos tóxicos e os mecanismos associados para misturas de metais, especialmente quando estes se apresentam em doses baixas (Wu et al., 2016). Para além disso, enquanto doses baixas de um único metal podem não causar efeitos adversos, quando associados a outros metais, podem apresentar maior risco para a saúde (Andrade et al., 2015).

A toxicidade que surge da exposição prolongada a metais, pode levar a casos de variados cancros, atraso mental e doenças neurológicas, cardiovasculares, renais e ósseas. Consequentemente, a exposição crónica a uma mistura de metais deve ser encarada com preocupação e vista como um problema de saúde pública (Chanpiwat et al., 2014), (Liu et al., 2015).

Geralmente estuda-se o efeito biológico de um único metal, e posteriormente o efeito combinado da mistura. Outra estratégia possível, passa por testar as misturas com ou sem base na toxicidade individual dos metais. Existem menos estudos baseados nesta estratégia (Lin et al., 2016).

Foram efetuados estudos para prever a neurotoxicidade de misturas contendo Pb, Mn e As.

A administração de uma mistura binária de Pb e Mn em ratos tem sido associada à redução do peso cerebral com uma maior extensão do que pela exposição a um único metal (Kim et al., 2009). Os níveis de Pb quando associado ao Mn também foram aumentados em várias regiões do cérebro, em comparação com a administração do metal sozinho. Também foram observadas alterações comportamentais, tais como hipoatividade e agravamento do comportamento agressivo induzido por Pb. Foram

efetuados testes de capacidade de aprendizagem, que mostraram que uma mistura de Pb e Mn prejudicou a aprendizagem em maior extensão do que a administração do Pb. Estes resultados mostram que ocorreu um efeito sinérgico de misturas metálicas binárias, mesmo em níveis subclínicos (Andrade et al., 2015). Em populações nas quais foi detetado no sangue a exposição à mistura binária de Mn e Pb, foi possível constatar um impacto negativo na inteligência de crianças em idade escolar (Kim et al., 2009).

Foram também efetuados estudos com a mistura binária de Pb e As. Esses estudos mostraram alterações neurotransmissoras, sendo que essas alterações não se manifestavam quando os animais eram expostos apenas ao Pb. No México foi analisada a mistura binária de As e Pb, onde se verificaram efeitos neuropsicológicos em crianças. Contudo não foram obtidos resultados conclusivos quanto às interações nesta mistura (Andrade et al., 2015).

Alguns estudos também se focaram na mistura de As e Mn, estes estudos mostraram que houve uma maior acumulação destes metais no cérebro de ratos em comparação com animais expostos a um único metal. Para além disso, em seres humanos também se verificou que quem apresentava maiores níveis dos metais no cabelo, apresentava também um QI, aprendizagem verbal e memória mais baixos (Rodríguez, Dufour, Carrizales, Díaz-Barriga, & Jiménez-Capdeville, 1998).

Em relação a mistura contendo Pb, Mn e As, mostrou que provoca alterações ao nível dos neurotransmissores (Andrade et al., 2015), (Wijayawardena, Megharaj, & Naidu, 2016).

As doenças neurológicas induzidas pela exposição a agentes neurotóxicos são frequentemente transtornos progressivos crónicos, onde por vezes faltam os sintomas de alerta, por vezes estes sintomas apenas se manifestam muito tempo após a exposição ao neurotóxico, tempo esse que pode ser crucial para a irreversibilidade da doença. Desta forma tem sido efetuados esforços com o intuito de identificar biomarcadores neuropatológicos e bioquímicos como indicadores precoces da doença (Wijayawardena et al., 2016), (Zhuang et al., 2014).

O cádmio apresenta toxicidade durante o desenvolvimento fetal, sendo um metal de transição com características idênticas às características do zinco. O cádmio interfere com a passagem do zinco pela placenta, provavelmente através da metalotioneína (MT) que é uma proteína de baixo peso molecular induzida na placenta pelo Cd. Esta proteína sequestra o Zn na placenta levando a deficiência de Zn fetal. O Cd pode também inibir a

absorção de Zn por microvesículas placentárias. Estes dois metais também podem competir diretamente para o transporte na membrana. Neste caso estamos perante mimetismo molecular (Asic & Of, n.d.), (Milton, Cooke, & Johnson, 2003), (Wijayawardena et al., 2016).

Segundo Liu et al., a exposição crónica a mistura de Cd e Pb esta associada a um risco aumentado de mortalidade por todos os cancros (Lou et al., 2013), (Zhuang et al., 2014).

Estudos avaliaram a toxicidade da mistura de vários metais:

- Um estudo avaliou misturas binárias em relação a sua neurotoxicidade e concluiu que no Mn e no Pb a toxicidade foi maior do que aditivo, em relação a toxicidade hematológica entre o Pb e Zn, o Pb e o Cu ou o Cu e o Zn foi menor do que aditivo (Lin et al., 2016).
- Um estudo sub-letal efetuado em diferentes espécies de minhocas com a seguinte mistura de metais (Cd / Zn / Pb / Cu, Cd / Zn / Cu, Cd / Cu, Cd / Zn e Zn / Cu) concluiu que quase todas as misturas produziam efeitos antagónicos (Lin et al., 2016).
- Um outro estudo efetuado por (Hagopian-Schlekat, Chandler, & Shaw, 2001) em copépodos de estuário com a mistura de Cd, Cu, Pb, Ni e Zn concluiu que estas substâncias têm um efeito sinérgico sobre os copépodos em meio-bentónico estuariano.
- Num estudo para avaliar a influência de um metal na reatividade pulmonar, testou-se uma mistura de vários metais contendo Cu, Fe, Pb, Mn e Zn, e em simultâneo testou-se cada metal sozinho e a mistura contendo todos os metais exceto o Zn. Concluiu-se que o Zn foi o metal mais tóxico (Adamson, Prieditis, Hedgecock, & Vincent, 2000).
- Um outro estudo debruçou-se sob o ser humano e a mistura de metais pesados (Pb, Cd, Hg, Cu, Zn, Mn, Cr e Ni) na citotoxicidade das células do fígado. A toxicidade individual de cada metal foi investigada. O Hg foi considerado o mais tóxico dos metais estudados. A toxicidade combinada da mistura de metais pode ser diferente da toxicidade individual de cada metal. Neste estudo verificou-se que na mistura (Pb + Cd + Hg + Ni + Cr), (Pb + Hg +

Cd), (Pb + Hg + Ni) e (Cd + Ni) ocorreu efeito sinérgico. Por outro lado na mistura (Cu + Zn + Mn) verificou-se um efeito antagónico (Lin et al., 2016).

- Em 2013 Lou et al., descobriram que havia efeito citotóxico antagónico na mistura de Ni e Cr em células de linfoblastos B humanos (Lou et al., 2013).
- Estudos publicados sugerem que os metais Cu, Zn e Mn apresentam antagonismo com outros metais (Lin et al., 2016).

Os efeitos combinados das misturas ainda são complicados, um metal pode ter um efeito sinérgico com um metal, mas desenvolver antagonismo com outro (Lin et al., 2016).

9. Conclusões

Os avanços tecnológicos e científicos que se têm registado no setor farmacêutico, permitiram a descoberta e a produção de fármacos mais adaptados e eficientes no combate às patologias existentes, este fator associado ao aumento da esperança média de vida, faz com que a população seja cada vez mais medicada com um maior número de fármacos e durante um maior período de tempo. Esta associação de fatores faz com que a exposição crónica aos resíduos presentes nos fármacos adquira uma importância relevante.

Atualmente já é possível avaliar com precisão e rigor a presença de resíduos metálicos contidos nos fármacos, através nas novas técnicas de espectroscopia, podendo assim saber o risco da exposição aos metais potencialmente presentes em cada fármaco ingerido.

Através dos estudos anteriormente referidos podemos concluir que nas misturas contendo Pb, Ni ou Hg, é constatado um efeito sinérgico, por outro lado as misturas com Zn e Cu geralmente apresentam um efeito antagónico. Os estudos mostram também que misturas binárias de Pb com Cd estão muitas vezes associadas a episódios de cancro. Com esta análise podemos também perceber que a exposição a múltiplos metais pode causar efeitos tóxicos, que estão ausentes aquando da exposição a um único metal em dose similar.

Os efeitos combinados das misturas ainda são complicados, um metal pode ter um efeito sinérgico com um metal, mas desenvolver antagonismo com outro.

Bibliografia

- Adamson, I. Y. R., Prieditis, H., Hedgecock, C., & Vincent, R. (2000). Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 166(2), 111–119. <http://doi.org/10.1006/taap.2000.8955>
- Allan, R. (1997). Introduction: Mining and metals in the environment. *Journal of Geochemical Exploration*, 58(2–3), 95–100. [http://doi.org/10.1016/S0375-6742\(97\)00004-6](http://doi.org/10.1016/S0375-6742(97)00004-6)
- Alves, F.E.; Silva, P.P; Guerra, W. (2010). Metais Do Grupo Da Platina : História, Propriedades E Aplicações. *Química* 119, 27–34.
- Andrade, V., Mateus, M., Batoréu, M., Aschner, M., & Santos, A. (2015). Lead, arsenic and manganese metal mixture exposures: focus on biomarkers of effect. *Biol Trace Elem Res*, 166(1), 229–262. <http://doi.org/10.1007/978-1-4614-5915-6>
- Apostoli, P. (2002). Elements in environmental and occupational medicine. *Journal of Chromatography B*, 778(1–2), 63–97. [http://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00442-X](http://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00442-X)
- Asic, H. E., & Of, C. (n.d.). *TOXICOLOGY*.
- Badalà, F., Nouri-mahdavi, K., & Raof, D. A. (2008). NIH Public Access. *Computer*, 144(5), 724–732. <http://doi.org/10.1038/jid.2014.371>
- Boobis, A., Budinsky, R., Collie, S., Crofton, K., Embry, M., Felter, S., ... Zaleski, R. (2011). Critical analysis of literature on low-dose synergy for use in screening chemical mixtures for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 41(5), 369–83. <http://doi.org/10.3109/10408444.2010.543655>
- Calderón, J., Ortiz-Pérez, D., Yáñez, L., & Díaz-Barriga, F. (2003). Human exposure to metals. Pathways of exposure, biomarkers of effect, and host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56(1), 93–103. [http://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00053-8](http://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00053-8)
- Chanpiwat, P., Lee, B. T., Kim, K. W., & Sthiannopkao, S. (2014). Human health risk assessment for ingestion exposure to groundwater contaminated by naturally occurring mixtures of toxic heavy metals in the Lao PDR. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(8), 4905–4923. <http://doi.org/10.1007/s10661-014-3747-0>
- De Capitani, E. M., De, E. M., & Resumo, C. (2009). Simpósio: CHUMBO E A SAÚDE HUMANA Capítulo VII Diagnosis and treatment of lead poisoning in children and adults. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 42(3), 319–29.
- Division, P. R. (2016). A political organisation set up in 1949 , the Council of Europe works to promote democracy and human rights continent-wide . It also develops common responses to social , cultural and legal challenges in its 47 member states ., 33(April 2015), 0–1.
- Dragun, Z., Tomic, S., & Puntaric, D. (2010). Monitoring of metal and metalloid content in dietary supplements on the Croatian market, 21, 885–889. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.12.005>
- EMA European Medicines Agency. (2008). Guideline on the Specification Limits for Residues of Metal Catalysts or Metal Reagents. *Regulation Document*, (February),

- 1–34. <http://doi.org/CPMP/SWP/QWP/4446/00> corr.
- EU. (2011). Scientific Committee on Health and Environmental Risks SCHER Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks SCENIHR Scientific Committee on Consumer Safety SCCS Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures. *European Commission for the Toxicity and Assessment of Chemical Mixture*, (November), 1–50. <http://doi.org/10.2772/37863>
- Félix, A. M. T. (2007). Fichas Toxicológicas. *Departamento de Saúde Pública E Planeamento Da ARSCentro*, 1–50.
- Ferreira, A. P., Horta, M. A. P., & Cunha, C. D. L. N. Da. (2010). Avaliação das concentrações de metais pesados no sedimento , na água e nos órgãos de *Nycticorax nycticorax* (Garça-da-noite) na Baía de Sepetiba, RJ, Brasil. *Gestão Costeira Integrada*, 10(2), 229–241.
- Figueiredo, A., Fernandes, T., Costa, I. M., Gonçalves, L., & Brito, J. (2016). Feasibility of wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry for the determination of metal impurities in pharmaceutical products and dietary supplements in view of regulatory guidelines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 122, 52–58. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.01.028>
- Fischer, L., Zipfel, B., Koellensperger, G., Kovac, J., Bilz, S., Kunkel, A., ... Hann, S. (2014). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP <232> / <233>. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 95, 121–129. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2014.02.016>
- Font, C., & Buendi, A. (2009). Determination of metal residues in active pharmaceutical ingredients according to European current legislation by using X-ray fluorescence spectrometry, 1253–1257. <http://doi.org/10.1039/b904064a>
- Forum, R. A. (2007). Framework for Metals Risk Assessment Framework for Metals Risk Assessment. *Environmental Protection*, (March).
- Friberg L, Nordberg G, V. V. (1979). *Handbook on the Toxicology of Metals*. (B. Press, Ed.). North-Holland.
- Gasser, U., Klier, B., Kühn, A. V, & Steinhoff, B. (2009). Current Findings on the Heavy Metal Content in Herbal Drugs, 37–50.
- Geral, M. (n.d.). FABRICO DE MEDICAMENTOS À BASE DE PLANTAS Princípio Instalações Documentação Amostragem Controlo de qualidade, 7–10.
- Gomes, A., & Virg, U. M. (n.d.). Alteração e Conservação dos Medicamentos, (figura 1).
- Gomez, M. R., Cerutti, S., Olsina, R. A., Silva, M. F., & Martínez, L. D. (2004). Metal content monitoring in *Hypericum perforatum* pharmaceutical derivatives by atomic absorption and emission spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34(3), 569–576. [http://doi.org/10.1016/S0731-7085\(03\)00643-5](http://doi.org/10.1016/S0731-7085(03)00643-5)
- Gonçalves, L., Costa, I. M., & Brito, J. (2011). Analytical Methods Assessment of metal elements in final drug products by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry, 1468–1470. <http://doi.org/10.1039/c1ay05133d>
- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G. T., & Shaw, T. J. (2001). Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine

- meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*, 51(3), 247–264. [http://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00102-1](http://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00102-1)
- Heinze, I., Gross, R., Stehle, P., & Dillon, D. (1998). Assessment of lead exposure in schoolchildren from Jakarta. *Environmental Health Perspectives*, 106(8), 499–501. <http://doi.org/10.1289/ehp.98106499>
- History, A. (2010). Pakistan Veterinary Journal. *Animals*, 8318(2), 85–92. <http://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3283638104>
- Holm, R., & Elder, D. P. (2016). Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87, 118–135. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.12.007>
- Honary, S., Ebrahimi, P., Naghibi, F., Mosaddegh, M., Shahhoseini, S., Ebrahimi, P., ... Shahhoseini, S. (2016). Study on the Simultaneous Determination of Pb and Cd in some Commercial Medicinal Plants by both Atomic Absorption and Voltametry Methods, 2719(July). <http://doi.org/10.1080/00032710701577500>
- ICH. (2013). Draft Consensus Guideline for Elemental Impurities Q3D. *International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, (July). Retrieved from http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3D/Q3D_Step2b.pdf
- Izah, S., Inyang, I., Angaye, T., & Okowa, I. (2016). A Review of Heavy Metal Concentration and Potential Health Implications of Beverages Consumed in Nigeria. *Toxics*, 5(1), 1. <http://doi.org/10.3390/toxics5010001>
- Kakkar, P., & Jaffery, F. N. (2005). Biological markers for metal toxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 19(2), 335–349. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2004.09.003>
- Kamo, M., & Nagai, T. (2008). An application of the biotic ligand model to predict the toxic effects of metal mixtures. *Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC*, 27(7), 1479–1487. <http://doi.org/10.1897/07-425>
- Kim, H. Y., Lee, C. K., Lee, J. T., Moon, C. S., Ha, S. C., Kang, S. G., ... Kang, M.-G. (2009). Effects of manganese exposure on dopamine and prolactin production in rat. *Neuroreport*, 20(1), 69–73. <http://doi.org/10.1097/WNR.0b013e328315cd35>
- Lentz, T. J., Dotson, G. S., Williams, P. R. D., Maier, A., Gadagbui, B., Pandalai, S. P., ... Mumtaz, M. (2015). Aggregate Exposure and Cumulative Risk Assessment—Integrating Occupational and Non-occupational Risk Factors. *Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, 12(sup1), S112–S126. <http://doi.org/10.1080/15459624.2015.1060326>
- Li, G., Schoneker, D., Ulman, K. L., Sturm, J. J., Thackery, L. M., & Kauffman, J. F. (2015). Elemental Impurities in Pharmaceutical Excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 104(12), 4197–4206. <http://doi.org/10.1002/jps.24650>
- Lin, X., Gu, Y., Zhou, Q., Mao, G., Zou, B., & Zhao, J. (2016). Combined toxicity of heavy metal mixtures in liver cells. *Journal of Applied Toxicology*, 36(9), 1163–1172. <http://doi.org/10.1002/jat.3283>
- Liu, L., Tao, R., Huang, J., He, X., Qu, L., Jin, Y., ... Fu, Z. (2015). Hepatic oxidative stress and inflammatory responses with cadmium exposure in male mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 229–236. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2014.11.029>

- Lou, J., Jin, L., Wu, N., Tan, Y., Song, Y., Gao, M., ... He, J. (2013). DNA damage and oxidative stress in human B lymphoblastoid cells after combined exposure to hexavalent chromium and nickel compounds. *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 533–540. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.053>
- May, X. S. (2005). Quantitative Determination of Essential and Trace Element Content of Medicinal Plants and Their Infusions by XRF and ICP Techniques Quantitative determination of essential and trace element content of medicinal plants and their infusions by XRF and ICP te, (May). <http://doi.org/10.1002/xrs.795>
- Milton, A., Cooke, J. A., & Johnson, M. S. (2003). Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *44*(3), 405–411. <http://doi.org/10.1007/s00244-002-2014-5>
- Mohamed, S. A., Elshal, M. F., Kumosani, T. A., Mal, A. O., Ahmed, Y. M., Almulaiky, Y. Q., Zamzami, M. A. (2016). Heavy metal accumulation is associated with molecular and pathological perturbations in liver of *Variola louti* from the Jeddah coast of red sea. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *13*(3), 1–11. <http://doi.org/10.3390/ijerph13030342>
- Muniz, D. H. de F., & Oliveira-Filho, E. C. (2008). Metais pesados provenientes de rejeitos de mineração e seus efeitos sobre a saúde e o meio ambiente. *Universitas: Ciências Da Saúde*, *4*(1), 83–100. <http://doi.org/10.5102/ucs.v4i1.24>
- Nageswara Rao, R., & Kumar Talluri, M. V. N. (2007). An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *43*(1), 1–13. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.004>
- Narayanam, M., Handa, T., Sharma, P., Jhajra, S., Muthe, P. K., Dappili, P. K., ... Singh, S. (2014). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Critical practical aspects in the application of liquid chromatography – mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *87*, 191–217. <http://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.027>
- Odewumi, C., Latinwo, L. M., Sinclair, A., Badisa, V. L. D., Abdullah, A., & Badisa, R. B. (2015). Effect of cadmium on the expression levels of interleukin-1alpha and interleukin-10 cytokines in human lung cells. *Molecular Medicine Reports*, *12*(5), 6422–6426. <http://doi.org/10.3892/mmr.2015.4316>
- Olszowski, T., Baranowska-Bosiacka, I., Gutowska, I., Piotrowska, K., Mierzejewska, K., Korbecki, J., ... Chlubek, D. (2015). The effects of cadmium at low environmental concentrations on THP-1 macrophage apoptosis. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(9), 21410–21427. <http://doi.org/10.3390/ijms160921410>
- Organização Mundial da Saúde. (2000). *Substâncias químicas perigosas à saúde e ao ambiente*.
- Pharmacopeia, E. (2013). *Determination of Metal Catalyst or Metal Reagent Residues* (in: 80 ed.).
- Prasad, A. S. (1979). Clinical, Biochemical, and Pharmacological Role of Zinc. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *19*(1), 393–426. <http://doi.org/10.1146/annurev.pa.19.040179.002141>

- Ramachandra, B. (2016). Development of Impurity Profiling Methods Using Modern Analytical Techniques. *Critical Reviews in Analytical Chemistry / CRC*, 8347(July), 1–13. <http://doi.org/10.1080/10408347.2016.1169913>
- Rieuwerts, J. S., Farago, M. E., Cikrt, M., & Bencko, V. (2000). Differences in lead bioavailability between a smelting and a mining area. *Water Air and Soil Pollution*, 122(1–2), 203–229. <http://doi.org/10.1023/A:1005251527946>
- Rocha, A. F. Da. (2009). Cádmió, chumbo, mercúrio: a problemática destes metais pesados na Saúde Pública: monografia : Cadmium, lead, mercury:the issue of these metals in Public Health?, 63. Retrieved from <http://repositorio-aberto.up.pt/handle/10216/54676>
- Rodrigues, J. C., Bueno, P. C., Fonseca, F. R., Alonzo, H. G. A. Villardi, J. W. R., & Costa, L. C. A. Rohlfs, D. B. (2011). Information System of Health Surveillance of Populations Exposed to Contaminated Soil applicability. *Cadernos de Saúde Coletiva*, 19(4), 411–416.
- Rodríguez, V. M., Dufour, L., Carrizales, L., Díaz-Barriga, F., & Jiménez-Capdeville, M. E. (1998). Effects of oral exposure to mining waste on in vivo dopamine release from rat striatum. *Environmental Health Perspectives*, 106(8), 487–491. <http://doi.org/10.1289/ehp.98106487>
- Shrestha, R. A., Lama, B., Joshi, J., & Sillanpää, M. (2008). Effects of Mn(II) and Fe(II) on microbial removal of arsenic (III). *Environmental Science and Pollution Research*, 15(4), 303–307. <http://doi.org/10.1007/s11356-008-0005-4>
- Smith, D., Bayer, L., & Strupp, B. J. (1998). Efficacy of Succimer Chelation for Reducing Brain Pb Levels in a Rodent Model. *Environmental Research*, 78(2), 168–176. <http://doi.org/10.1006/enrs.1998.3854>
- Tavares, Tania M. ; Carvalho, F. M. (1992). *Avaliação de exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: Exemplos do Recôncavo Baiano*. (Q. Nova, Ed.). São Paulo.
- Technique, D. (2013). Elemental Impurities —, 27(3), 1–3.
- The United States Pharmacopeial Convention. (2013). (233) Elemental Impurities — Procedures. *Revision Bulletin*, (c), 232–234.
- Vessecchi, R., Galembeck, S. E., Lopes, N. P., Nascimento, P. G. B. D., & Crotti, A. E. M. (2008). Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. *Química Nova*, 31(4), 840–853. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422008000400026>
- Wijayawardena, M. A. A., Megharaj, M., & Naidu, R. (2016). *Exposure, Toxicity, Health Impacts, and Bioavailability of Heavy Metal Mixtures. Advances in Agronomy* (Vol. 138). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/bs.agron.2016.03.002>
- Wollein, U., Bauer, B., Habernegg, R., & Schramek, N. (2015). European Journal of Pharmaceutical Sciences Potential metal impurities in active pharmaceutical substances and finished medicinal products – A market surveillance study. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 77, 100–105. <http://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.05.028>
- Wu, X., Cobbina, S. J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., & Yang, L. (2016). A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(9), 8244–8259. <http://doi.org/10.1007/s11356-016-6333-x>

Zhuang, P., Lu, H., Li, Z., Zou, B., & McBride, M. B. (2014). Multiple exposure and effects assessment of heavy metals in the population near mining area in South China. *PLoS ONE*, 9(4), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0094484>

