



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



Viktoriya Ivasiv

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novel Inhibitors of IMP-1. Focus on sulfur containing compounds” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Ana Flório e Dra. Sandra Palma e da Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2018

Viktoriya Ivasiv

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Novel Inhibitors of IMP-1. Focus on sulfur containing compounds" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Ana Flório, da Dra. Sandra Palma e da Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



# Declaração de autoria

Eu, Viktoriya Ivasiv, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013156708, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Novel inhibitors of IMP-I. Focus on sulfur containing compounds” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 3 de setembro de 2018.

Viktoriya Ivasiv

# Agradecimentos

Aos meus pais, Lyudmyla e Ivan, vou estar eternamente grata pelo todo o apoio que me deram, não só durante estes cinco anos, mas ao longo de toda a minha vida. Agradeço a minha mãe, por todas as vezes que me dizia “já é tarde, vai dormir e amanhã continuas a estudar” e agradeço ao meu pai, por logo a seguir dizer “acho que ainda consegues mais um pouco”. Este trabalho é dedicado aos meus pais, os pilares da minha vida.

À minha orientadora da monografia, Professora Doutora Maria Manuel Cruz Silva, um especial obrigada. Agradeço a sua ajuda e o seu apoio, não só durante a realização deste trabalho, mas também ao longo destes anos de faculdade.

À toda equipa da Farmácia Central das Caldas da Rainha, por tudo o que me ensinaram e pela confiança que depositaram em mim.

À toda equipa dos Laboratórios Expanscience, pela disponibilidade e pelo todo o apoio que me deram ao longo dos meses de estágio.

Aos meus amigos, Ana, Iris, Jorge, Jéssica, Marlene, Tânia, Anita, Marina e Stéphanie, sem os quais estes anos não teriam sido os mesmos.

Por fim, à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e linda cidade de Coimbra, por me permitir ganhar alguma independência dentro da minha dependência.

# Contents

<b>PART I MONOGRAPH - “NOVEL INHIBITORS OF IMP-1. FOCUS ON SULFUR CONTAINING COMPOUNDS”</b> .....	<b>6</b>
RESUMO.....	7
ABSTRACT .....	8
<b>CHAPTER 1</b> .....	<b>9</b>
INTRODUCTION .....	9
IMPORTANCE OF ANTIBIOTICS .....	9
B-LACTAM ANTIBIOTICS.....	10
<b>CHAPTER 2</b> .....	<b>12</b>
ANTIBIOTIC RESISTANCE.....	12
B-LACTAMASES .....	13
CLASSIFICATION OF B-LACTAMASES.....	14
<b>CHAPTER 3</b> .....	<b>15</b>
METALLO B-LACTAMASE.....	15
STRUCTURE OF METALLO-B-LACTAMASES.....	17
CATALYTIC MECHANISM OF METALLO-B-LACTAMASES .....	19
METALLO-B-LACTAMASE INHIBITORS .....	21
SULFUR CONTAINING COMPOUNDS .....	22
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>27</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>28</b>

<b>PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA.....</b>	<b>29</b>
RESUMO.....	30
ABSTRACT .....	31
INTRODUÇÃO.....	32
<i>STRENGTHS</i> - FORÇAS.....	33
<i>WICKNESSES</i> - FRAQUEZAS.....	35
<i>OPPORTUNITIES</i> - OPORTUNIDADES.....	36
<i>THREATS</i> - AMEAÇAS.....	38
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>PART III - RELATÓRIO DO ESTÁGIO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA .....</b>	<b>41</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>42</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>43</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>44</b>
<i>STRENGTHS</i> - FORÇAS.....	45
<i>WEAKNESSES</i> - FRAQUEZAS.....	48
<i>OPPORTUNITIES</i> - OPORTUNIDADES.....	49
<i>THREATS</i> - AMEAÇAS.....	51
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>

# Siglas, Acrónimos e Abreviaturas

**BL**  $\beta$ -lactamases

**CNP** Código Nacional de Produto

**DIM** Delegado de Informação Médica

**DM** Dispositivos médicos

**IMP** Imipenemases

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

**MBL** metallo-  $\beta$ -lactamases

**MNSRM** Medicamentos não sujeitos a receita médica

**MSRM** Medicamentos sujeitos a receita médica

**PC** Produtos cosméticos

**SWOT** *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

Part I Monograph - “Novel Inhibitors of  
IMP-I. Focus on sulfur containing  
compounds”



# Resumo

Uma das maiores preocupações dos profissionais de saúde e da comunidade científica é a significativa presença de resistência aos antibióticos em todo o mundo. Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos correspondem a classe de agentes antibacterianos mais prescritos. Contudo, ao longo dos anos, tem se observado uma crescente resistência a estes fármacos. Um dos principais mecanismos de resistência passa pela expressão de  $\beta$ -lactamases (BL), enzimas presentes em diversas espécies de bactérias e que conseguem de uma forma eficaz inativar estes fármacos.

Atualmente, a estratégia utilizada para superar a ação das BL é a utilização de uma terapêutica combinada, associando aos antibióticos moléculas inibidoras das BL com pouca ou nenhuma atividade antimicrobiana, como é o caso da amoxicilina associada com o ácido clavulânico.

Existe uma classe de BL estruturalmente diferente, as metalo- $\beta$ -lactamases (MBL) que, além terem um espectro de ação substancialmente alargado, isto é, conseguem hidrolisar praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, têm sido isoladas em estirpes bacterianas patogénicas.

Nos últimos anos, vários grupos científicos trabalharam para encontrar novas moléculas com atividade inibitória nestas enzimas, sendo que foi possível identificar algumas famílias de potenciais candidatos. Todavia, neste momento, clinicamente não existe nenhum inibidor eficaz para estas enzimas.

As MBL IMP-I correspondem ao grupo de enzimas com elevado espectro de ação e além disso são geneticamente codificadas em cassetes móveis que são facilmente transmissíveis entre diferentes bactérias, podendo estar na origem da multirresistência bacteriana, o que justifica o interesse na descoberta de inibidores destas enzimas.

Palavras-chave: antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, enzimas,  $\beta$ -lactamases, metalo- $\beta$ -lactamases, resistência bacteriana, inibidores, bactérias.

# Abstract

One of the major concerns of health professionals and the scientific community is the noticeable presence of antibiotic resistance throughout the world.  $\beta$ -lactam antibiotics correspond to the most prescribed class of antibacterial agents. Over the years, however, increasing resistance to these drugs has been observed. One of the main mechanisms of resistance is the expression of  $\beta$ -lactamases (BL), enzymes which are present in several species of bacteria that effectively inactivate these drugs.

Currently, the strategy used to overcome the action of BL is the use of a combined therapy, associating antibiotics, with inhibitory molecules, with little or none antimicrobial activity, but which have a high affinity to BL, as is the case of amoxicillin associated with clavulanic acid.

There is a structurally different class of BL which is currently generating major concerns, the metallo- $\beta$ -lactamases (MBL). These enzymes not only have a substantially broad spectrum of action, this is, they succeed in hydrolysing virtually almost all  $\beta$ -lactams, but they have also been isolated in pathogenic bacterial strains.

In the last years, several scientific groups have been working to find novel molecules with inhibitory activity against these enzymes and have already identified some families of potential candidates. However, at this moment, there is no inhibitor clinically efficient.

MBL IMP-I corresponds to the group of enzymes with a high action spectrum which are genetically encoded in mobile cassettes that are easily transmissible among different bacteria. It may also be the source of multidrug resistant bacteria, which justifies the interest in the discovery of inhibitors to these enzymes.

Keywords:  $\beta$ -lactam antibiotics, enzymes,  $\beta$ -lactamases, metallo- $\beta$ -lactamases, antibiotic resistance, inhibitors, bacteria.

## Chapter I

# Introduction

It all started not that long ago, when in 1930s Alexander Fleming discovered the first antibiotic, penicillin, but only in 1940s the therapeutic value of this drug was recognised<sup>1</sup>. Penicillin was considered by many as “the miracle drug”<sup>2</sup>. This drug offered new hope, the possibility to treat many bacterial infections, for which there was no available therapeutic procedure. This discovery is one of the most important marks in the history of medicine.<sup>1</sup>

The development of antibiotics has significantly contributed to increase the life expectancy and to improve the quality of life. Some common illnesses are now easily treated with antibiotics, when in the past they often led to serious complication.<sup>3</sup>

Unfortunately, antibiotic resistance has developed side by side with the use of antibiotics and nowadays it is one of the biggest threats to public health. The overuse and the incorrect use of antibiotics as well as the continual evolution and adaptation of microorganisms are the main causes of multidrug resistance.<sup>4,5</sup>

There are diverse groups of antibiotics available but, for the multidrug resistance infections there are only a few therapeutic options available. So, it is clear that there is an urgency not only of new classes of antibiotics but also of novel resistance inhibitors, to effectively tackle multi-resistant infections.<sup>6</sup>

## Importance of antibiotics

It is impossible to imagine a world without antibiotics. The use of these drugs has allowed to save countless lives and has had a significant role in the advances in medicine and surgery. They have successfully prevented or treated infections in a highly diverse group of patients, like those who have chronic diseases, who received anticancer treatments, and who had been submitted to surgery. Also, they have had a substantial impact in the increase of life expectancy and quality of life. In developing countries, the use of antibiotics is responsible for the decrease of morbidity and mortality caused by poverty-related infections.<sup>5</sup>

Antibiotics can have either bacteriostatic or bactericidal activity. Bacteriostatic activity interferes with bacterial division and it is the host immune system that eliminates the bacteria. On the other hand, bactericidal activity directly kills bacteria. Generally, antibiotics

that inhibit the cell wall synthesis have bactericidal activity, as it is the case of the  $\beta$ -lactam antibiotics.<sup>7,8</sup>

## $\beta$ -Lactam antibiotics

The  $\beta$ -lactam antibiotics are one of the most commonly prescribed antibacterial agents in bacterial infections.<sup>9</sup> This class of antibacterial agents includes the penicillins, cephalosporins, monobactams and carbapenem.<sup>7,8</sup> All of them share a common core structure, a four-membered cyclic amide, the  $\beta$ -lactam ring (Figure 1).<sup>10</sup> The first  $\beta$ -lactam antibiotic ever used in medical practice was penicillin in the 1940s. Since that date others were discovered, synthesised, and successfully used to prevent and treat bacterial infections.<sup>1</sup>

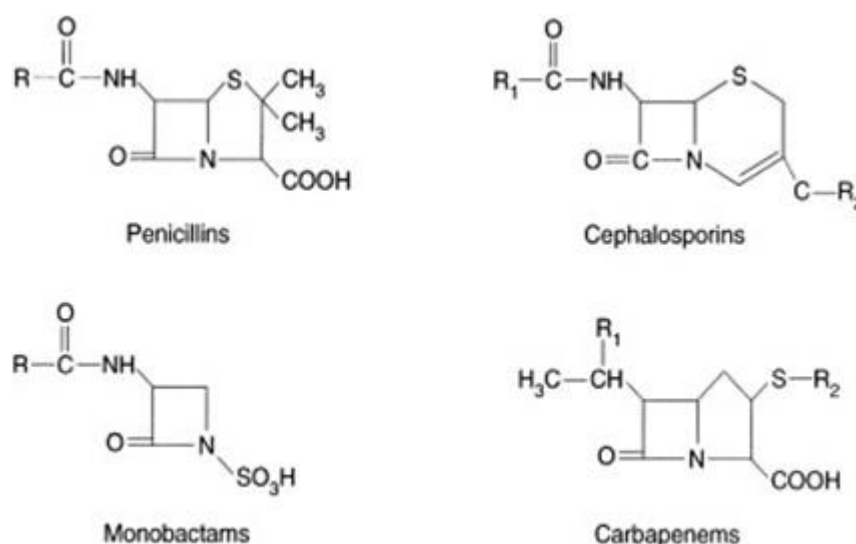


Figure 1. Chemical structures of  $\beta$ -lactam antibiotics. Adapted from Khan and Solensky, 2010<sup>10</sup>

The structural organisation of bacteria is the basis of the mechanism of action of the  $\beta$ -lactam antibiotics. Bacteria are unicellular microorganisms included in the group of prokaryotic cells. In the literature there are two different types of cells described, the eukaryotic and the prokaryotic cells. They differ in all kinds of ways, including size, structural complexity, and organisation of genetic material (Table 1). One of the biggest differences is the presence of a true nucleus and other subcellular organelles which are bound by a membrane in the eukaryotic cells. On the other hand, prokaryotic cells lack such organelles. Instead, they present the nucleoid, which is a closed loop of double stranded supercoiled DNA, but there may also be some additional DNA in the form of a plasmid. Another difference is the presence of a cell wall in the prokaryotic cells.<sup>11</sup> This cell wall allows the

maintenance of the integrity of the bacteria and confers them resistance and mechanical strength. The major part of the cell wall is composed of peptidoglycan, which is made up of N-acetylglucosamine, N-acetylmuramic acid and a short peptide chain, of l-alanine, d-alanine, d-glutamic acid and either l-lysine or diaminopimelic acid (DAP). This last amino acid is only found in the cell walls of prokaryotes. The synthesis of the peptidoglycan starts inside the cell, with the production of precursor molecules, which are transported across the plasma membrane by a lipid carrier, bactoprenol phosphate, before being incorporated into the cell wall structure. Finally, the peptidoglycan strands are cross-linked by the formation of peptide bridges, catalysed by specific enzymes, called transpeptidases, also known as penicillin-binding proteins (PBPs), which are the targets of  $\beta$ -lactam antibiotics.<sup>11,12</sup>

$\beta$ -Lactams act as inhibitors of transpeptidases, specifically acyl serine transferases. They mimic the D-Ala-D-Ala sequence, acting as false substrates for D-alanyl-D-alanine transpeptidase. The serine residue of the transpeptidases reacts with the carbonyl of the  $\beta$ -lactam ring to give inactive acyl enzymes. By inhibiting cell wall synthesis,  $\beta$ -lactams are usually active only against rapidly dividing bacteria. Their bactericidal effect results from indirect mechanisms, mostly the activation of autolytic enzymes.

Even though all bacteria have peptidoglycan, there are significant differences between the two structural types, the Gram-positive and the Gram-negative bacteria. Gram-positive cell walls (Figure 2)<sup>13</sup> are relatively simple in structure, including several layers of peptidoglycan connected to each other by cross-linkages to form a strong, rigid, scaffolding wall. In addition, they have acidic polysaccharides called teichoic acids, these have phosphate groups that impart an overall negative charge to the cell surface. Gram-negative cells (Figure 2)<sup>13</sup> have a much thinner layer of peptidoglycan, however, this wall is protected by an outer membrane, made of lipoproteins, polysaccharide, and phospholipid, which means that  $\beta$ -lactam must cross the outer membrane via porin channels in order to bind to the transpeptidase.<sup>11,13</sup>

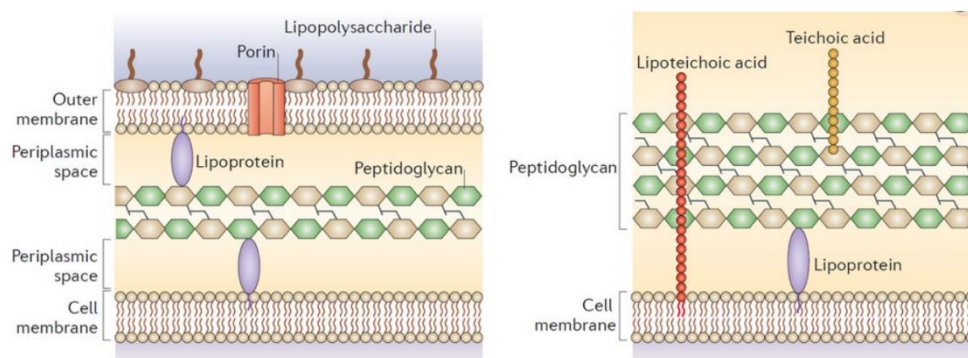


Figure 2. Cell wall composition of Gram-positive and Gram-negative bacteria. Adapted from Brown *et al.*, 2015<sup>13</sup>

Table I. Similarities and differences between Prokaryotic and Eucaryotic cells. Adapted from Hogg, 2005<sup>11</sup>

<b>Similarities</b>	
Cell contents bounded by a plasma membrane Genetic information encoded on DNA Ribosomes act as site of protein synthesis	
<b>Differences</b>	
Prokaryotic	Eucaryotic
<b>Size</b>	
Typically 1-5 $\mu\text{m}$	Typically 10-100 $\mu\text{m}$
<b>Genetic material</b>	
Free in cytoplasm Single circular chromosome or nucleoid Histones absent	Contained within a membrane-bound nucleus Multiple chromosomes, generally in pairs DNA complexed with histone proteins
<b>Internal Features</b>	
Membrane-bound organelles absent Ribosomes smaller (70S), free in cytoplasm Respiratory enzymes bound to plasma membrane	Several membrane-bound organelles present, including mitochondria, Golgi body and endoplasmic reticulum Ribosomes larger (80S), free in cytoplasm or attached to membranes Respiratory enzymes located in mitochondria
<b>Cell wall</b>	
Usually based on peptidoglycan	When present, based on cellulose or chitin
<b>External features</b>	
Cilia absent Flagella, if present, composed of flagellin. Provide rotating motility Pili may be present Outside layer (slime layer, capsule, glycocalyx) present in some types	Cilia may be present Flagella, if present, have complex (9+2) structure. Provide "whiplash" motility Pili absent Pellicle or test present in some types

## Chapter 2

# Antibiotic Resistance

One of the most debated topics nowadays is the quick increase of antibiotic resistance and multidrug resistance. The excessive and incorrect use of antibiotics, as well as the continual evolution and adaptation of microorganisms led to multidrug resistance.<sup>3,14</sup> Infections that are caused by bacterial strains, considered as susceptible to an antibiotic, can be treated with high probability of clinical success. On the other hand, infections caused by bacterial strains categorized as resistant to antibiotic may not respond to treatment.<sup>15</sup> There

is undeniable evidence that new resistance mechanisms are emerging and spreading globally, threatening our ability to treat common infectious diseases. According to the World Health Organization infections such as pneumonia, tuberculosis, blood poisoning, gonorrhoea and foodborne diseases “are becoming harder, and sometimes impossible, to treat as antibiotics become less effective”.<sup>16</sup> Unfortunately, bacteria have different mechanisms to resist to the antibiotics, which makes more challenging the task to find a solution to this great treat.<sup>5</sup>

Antibiotic resistance can occur naturally, intrinsic to the microorganism in question, or it may be acquired, either as a result from a mutation of genes involved in normal physiological processes and cellular structures or from the acquisition of foreign resistance genes. It may also result from a combination of natural and acquired resistance.  $\beta$ -lactam resistance is becoming an increasing worldwide problem, in both hospitals and community settings. At the cellular level, bacteria can become resistant to  $\beta$ -lactam antibiotics by chemical modification of the antibiotic target, this means that they can alter the penicillin-binding proteins and decrease the affinity for  $\beta$ -lactams, by restricting the antibiotic access to the targets through efflux mechanisms or most frequently by producing  $\beta$ -lactamases (BL), which are enzymes able to inactivate the  $\beta$ -lactam ring.<sup>3,4,8,17</sup>

## $\beta$ -Lactamases

The most common and most efficient mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics is the production of  $\beta$ -lactamases enzymes.<sup>18</sup> These enzymes are able to inhibit the activity of the  $\beta$ -lactam antibiotics by hydrolysing the  $\beta$ -lactam ring, which is the transverse core to a different number of antibiotics, as result of the hydrolysis antibiotics can no longer exert their activity.<sup>12</sup> BL can be encoded in chromosomes or plasmids and the resistant traits can be easily transferred through horizontal plasmid transfer among distinct types of bacteria, which can explain the extensive spread amongst pathogenic bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, and other pathogens which are responsible for nosocomial infections.<sup>3,9</sup> Since the  $\beta$ -lactam antibiotics are the most common class of antibiotics used worldwide, the existence of these  $\beta$ -lactamases represents great threat to public health.

# Classification of $\beta$ -lactamases

The use of different generations of antibiotics has been closely followed by the emergence of new  $\beta$ -lactamases. Drawz *et al*, make reference to the identification of over 850 BL variants.<sup>19</sup> Different classifications have been proposed based on their profile structure or mechanism of action.<sup>20</sup>

The Ambler's classification divides the  $\beta$ -lactamases in four groups: A, B, C and D, based on the primary structures (Table 2).<sup>19</sup>

Table 2.  $\beta$ -lactamase classification schemes. Adapted from Drawz *et al.*, 2010.<sup>19</sup>

Amber class	Medeiros Class	Preferred substrates	Representative enzyme(s)
<b>A (serine penicillinases)</b>	2a	Penicillins	PCI from <i>S.aureus</i>
	2b	Penicillins, narrow-spectrum cephalosporins	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	Penicillins, narrow and extended-spectrum cephalosporins	SHV-2 to SHV-6, TEM-3 to TEM-26, CTX-Ms
	2br	Pecillins	TEM-30, SHV-72
	2c	Penicillins, carbenicillin	PSE-1
	2e	Extended-spectrum cephalosporins	FEC-1, CepA
	2f	Penicillins, cephalosporins, carbapenems	KPC-2, SME-1, NMC-A
<b>B (metallo-<math>\beta</math>-lactamases)</b>	3	Most $\beta$ -lactams, including carbapenems	IMP-1, VIM-1, CcrA and BclI (B1); CphA (B2); LI (B3)
<b>C (cephalosporinases)</b>	1	Cephalosporins	AmpC, CMY-2, ACT-1
<b>D (oxacillinases)</b>	2d	Penicillins, cloxacillin	OXA-1, OXA-10
<b>Not classified</b>	4		

The  $\beta$ -lactamases belonging to classes A, C and D are serine proteases, sharing common structural catalytic features with essential transpeptidases. The mechanism of action of serine  $\beta$ -lactamases can be summarized in three major steps: (1) substrate recognition, (2) attack of the  $\beta$ -lactam ring by the active serine residue, leading to an acyl-enzyme intermediate, and (3) attack to this latter intermediate by an activated water molecule, releasing the inactivated antibiotic (Figure 3). The major difference between class A, C and D  $\beta$ -lactamases lies in the position of the hydrolytic water molecule.<sup>19,21</sup> For these serine-proteases, especially for the class A there are several inhibitors clinically available,



which are administered in combination with  $\beta$ -lactam antibiotics, as for instance the clavulanic acid, tazobactam, sulbactam and avibactam.<sup>3</sup> Unfortunately, there is no class B MBL inhibitor clinically available yet.<sup>18</sup>

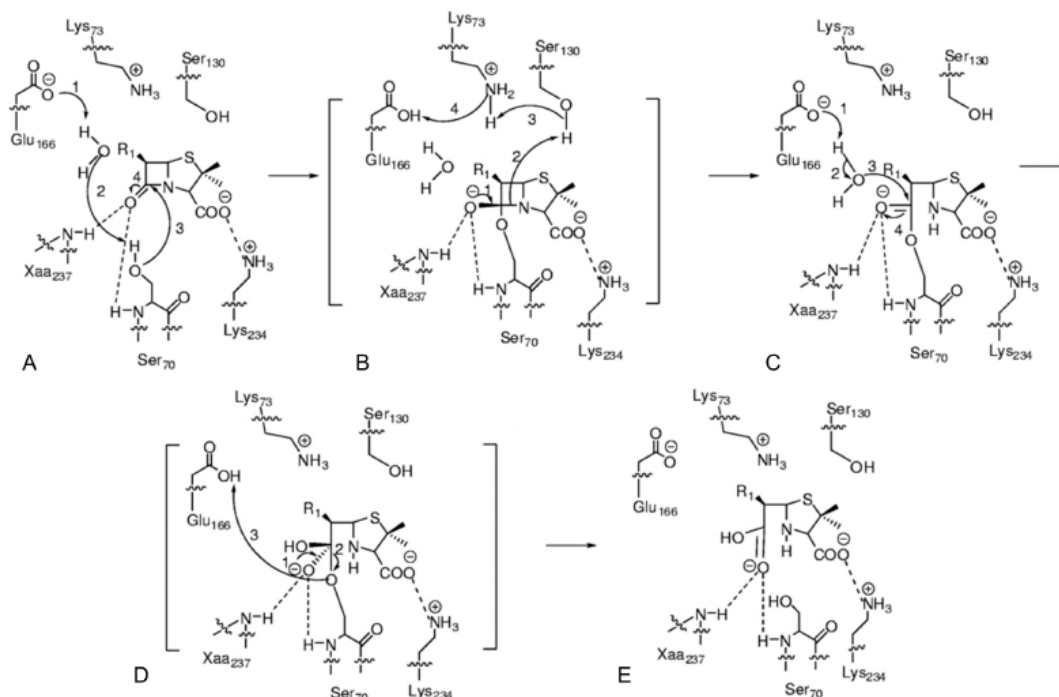


Figure 3. Proposed reaction mechanism for a penicillin  $\beta$ -lactam substrate and a class A serine  $\beta$ -lactamase enzyme. Adapted from Drawz *et al.*, 2010.<sup>19</sup>

## Chapter 3

# Metallo $\beta$ -lactamase

Class B metallo- $\beta$ -lactamases are zinc dependent metalloenzymes, which means that they require one or two  $\text{Zn}^{2+}$  ions to be catalytically active.<sup>22</sup> These enzymes have a broad substrate profile and can inactivate all  $\beta$ -lactam antibiotics except monobactams.<sup>9</sup> The MBL are not inhibited by the same  $\beta$ -lactamases inhibitors that are clinically used against the serine-based class A  $\beta$ -lactamases, such as clavulanic acid, tazobactam, sulbactam and avibactam.<sup>23</sup> However, metal chelators, as EDTA can inactivate them.<sup>24</sup> As a family, MBL can be subdivided in three sub-families, based on primary amino acid sequence homology (Table 3)<sup>9</sup>. Sub-family B1 has the most clinically relevant MBL (e.g., IMP-, VIM-and NDM-types) which typically binds one or two equivalents of zinc ion. Sub-family B2 has the fewest members, it is represented by CphA and includes different enzymes that are produced by

species of *Aeromonas*, which typically bind one equivalent of zinc ion in their active form. Sub-family B3 binds two equivalents of zinc ion but has a different primary Zn<sub>2</sub> coordination shell and contains LI, GOB-I, FEZ-I and other enzymes. Sub-families B1 and B3 enzymes have a broad substrate spectrum and usually exhibit maximum activity as di-zinc species, on the other hand, sub-family B2 MBLs are mono-zinc enzymes and show narrow-spectrum activity against carbapenems, with none or almost none activity against penicillins and cephalosporins.<sup>9,19,20,25</sup>

When the MBL were first discovered they were not considered a serious threat to antibiotic therapy as they were found chromosomally encoded and in non-pathogenic organisms. Unfortunately, this condition altered with the widely dissemination of these enzymes among Gram-negative pathogens, such as Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. Furthermore, some types of these enzymes are encoded in mobile genetic elements such as plasmids, which allow horizontal transfer of genetic material among bacteria. The combination of these factors can be responsible for the emergence of multidrug resistant bacteria.<sup>4,9</sup>

Clinically there are no class B MBL inhibitors available and the high structural and functional heterogeneity represents a big challenge for the design of clinically-useful and wide spectrum MBL inhibitors.<sup>19</sup>

Table 3. Metallo-β-lactamases from sub-families B1, B2 and B3. Adapted from Palzkill, 2013.<sup>9</sup>

Sub-family	Enzyme <sup>1</sup>	Organism <sup>2</sup>
<b>B1</b>	Bc II	<i>Bacillus cereus</i>
	CcrA	<i>Bacteroides fragilis</i>
	IMP-I	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	VIM-2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
	VIM-4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
	VIM-7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
	BlaB	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>
	SPM-I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	NDM-I	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>
	VIM-I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i>
	GIM-I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	SIM-I	<i>Acinetobacter baumannii</i>
	DIM-I	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
	TMB-I	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	Bla2	<i>Bacillus anthracis</i>
KHM-I	<i>Citrobacter freundii</i>	
<b>B2</b>	CphA	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	Sfh-I	<i>Serratia fonticola</i>
	ImiS	<i>Aeromonas veronii</i>

<b>B3</b>	LI	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	FEZ-I	<i>Legionella gormanii</i>
	BJP-I	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	AIM-I	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	THIN-B	<i>Janthinobacterium lividum</i>
	GOB-I	<i>Chryseobacterium meningoseptica</i>
	CAU-I	<i>Caulobacter crescentus</i>
	CAR-I	<i>Erwinia caratovora</i>
	SMB-I	<i>Serratia marcescens</i>
	POM-I	<i>Pseudomonas otitidis</i>
	CRB I I	Uncultured bacterium

<sup>1</sup> Enzyme variants are not included in this table unless an X-ray structure of the variant is available. For example, there are many variants of IMP-I that are not listed in the table.

<sup>2</sup>The strains listed represent the original strain(s) for which the enzyme was identified and does not include the bacteria to which the gene has spread.

## Structure of metallo- $\beta$ -lactamases

The MBL family shows diverse range of sequences with low identity (25%) among some enzymes.<sup>9</sup> The crystal structures of multiple MBL have been determined by X-ray diffraction and revealed structural similarity of the MBL, a characteristic  $\alpha\beta/\beta\alpha$  sandwich fold with the active site is located between two  $\beta$ -sheets.<sup>9,26</sup>

As previously reported the MBL are divided in three sub-families, B1, B2 and B3, this division is based in the amino acid sequence in the active site that coordinates with the  $Zn^{2+}$  ions and substrate selectivity.<sup>2,9</sup> The active side of MBL has either one or two  $Zn^{2+}$  ions (Zn 1 and Zn2). Most of MBL contain two  $Zn^{2+}$  ions in the active site, except for sub-family B2 enzymes which are only catalytically active when coordinated with a single  $Zn^{2+}$  ion. The Zn 1 binding site includes three histidines, while the ligands for the Zn2 site contain three different amino acids, a cysteine, a histidine and an aspartate (Figure 4).<sup>9,26,27</sup>

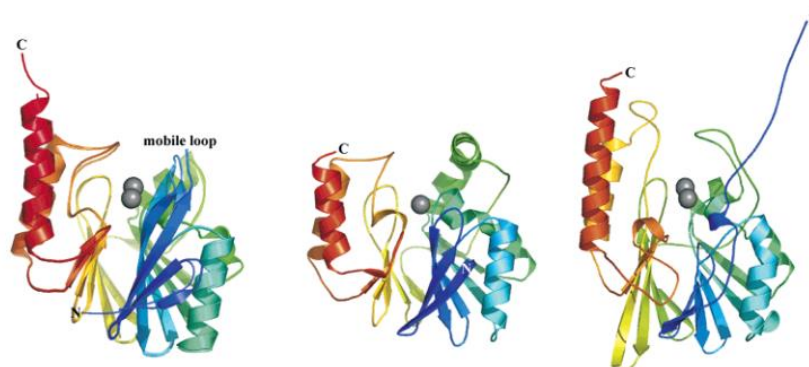


Figure 4. Representative metallo- $\beta$ -lactamase structures: *B. fragilis* CcrA (B1, left) *A. hydrophila* CphA (B2, center), and *S. maltophilia* LI (B3, right). The protein main chains are color-ramped from N (blue) to C (red) termini. Zinc ions are rendered as grey spheres. Adapted from Crowder *et al*, 2006.<sup>27</sup>

Through the study of the crystal structures it was possible to understand the geometry of the coordination in both sites (Zn1 and Zn2) in the sub-family B1. In the Zn1 site the zinc is tetrahedrally coordinated to three histidines and a water molecule. In the Zn2 site the metal is coordinated with three residues (cysteine 221, aspartate 120, histidine 263), two water molecules in a trigonal bipyramid geometry (Figure 5).<sup>26,27</sup>

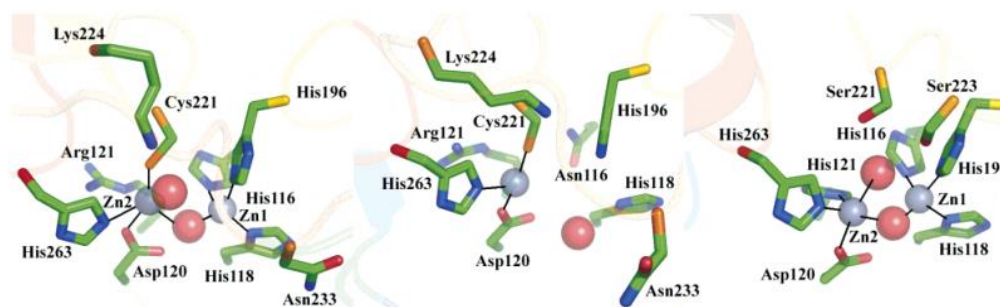


Figure 5. Metallo-β-lactamase active sites: *B. cereus* BclI (B1, left), *A. hydrophila* CphA (B2, center), and *S. maltophilia* L1 (B3, right). Zinc ions are rendered as gray spheres, and water molecules are rendered as red spheres. Coordination bonds are shown as solid lines. Adapted from Crowder *et al*, 2006.<sup>27</sup>

The differences in the amino acid sequence of the sub-families are reflected in the catalytic properties of the enzymes. For example, the B1 and B3 enzymes are most active with two zinc ions (Zn1 and Zn2) bind in the active site, contrarily the binding of the second zinc ion in the B2 enzymes inhibits catalysis. The B1 and B3 sub-families have a wide spectrum substrate profile, which includes penicillins, cephalosporines and carbapenems while the B2 sub-family efficiently hydrolyses only carbapenems (Table 4).<sup>9</sup>

Table 4. Residues usually coordinating Zn<sup>2+</sup> ions in each MBL sub-family. Adapted from Palzkill, 2013.<sup>9</sup>

Sub-family	Aminoacids						Substrate profile
	Zn1			Zn2			
<b>B1</b>	His 116	His 118	His 196	Asp 120	Cys 221	His 263	Broad spectrum <sup>1</sup>
<b>B2</b>	Asn 116	His 118	His 196	Asp 120	Cys 221	His 263	Carbapenems
<b>B3</b>	His/Gln	His 116	His 118	Asp 120	His 121	His 263	Broad spectrum <sup>1</sup>

<sup>1</sup> penicillins, cephalosporins, carbapenems.

# Catalytic mechanism of metallo- $\beta$ -lactamases

A profound understanding of the catalytic mechanism of MBL will facilitate the rational design of inhibitors. The hydrolysis of the  $\beta$ -lactam involves two major steps, a nucleophilic attack on the carbonyl group and C-N bond cleavage.<sup>9</sup>

For the sub-families B1 and B3, e.g., di-zinc MBL, hydrolysis appears to occur by cleavage of the amide bond of the  $\beta$ -lactam ring by a nucleophilic attack of the hydroxide ion on the carbonyl carbon, resulting in the release of the hydrolysed product. It is important to note that the mechanism described below may not be the same for all the enzymes, since there are studies that point some variances between different enzymes as well as different substrates on the same enzyme.<sup>9,28</sup>

The catalysis initiates with the binding of substrate ( $\beta$ -lactam) to the active site. The carbonyl oxygen interacts with Zn1 while the carboxyl group on the fused ring and the nitrogen on the  $\beta$ -lactam ring bind to the Zn2. The two zinc atoms, combined with the Asp/Lys stabilize the hydroxide ion, and between them an ideal position is created to attack the carbonyl carbon. From the nucleophilic attack, of the hydroxide ion on the carbonyl carbon results a tetrahedral intermediate. The breakdown of this intermediate and the cleavage of the amide bond is parallel with the protonation of nitrogen, liberating the final product. In this case, the stabilizing of tetrahedral intermediate and the protonation of the nitrogen by the hydroxide ion depends on the Zn2 and the Asp (Figure 6).<sup>29,30</sup>

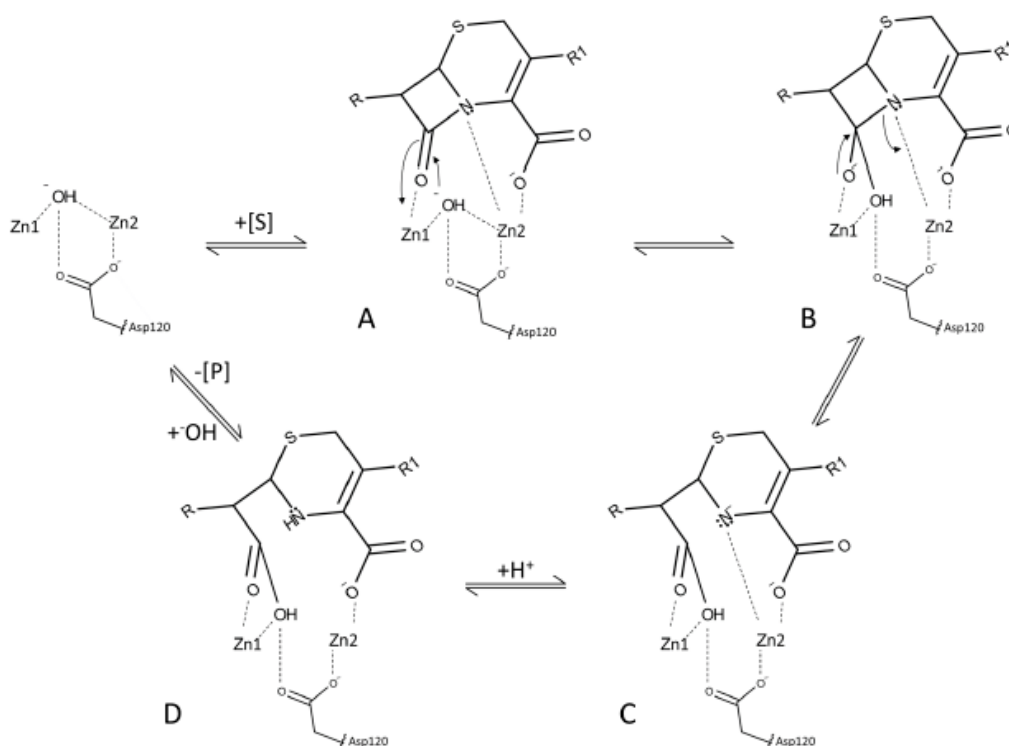


Figure 6. Proposed catalytic mechanism of di-zinc MBLs. Adapted from Mojica *et al*, 2017.<sup>29</sup>

In the literature, we can find information about computational substrate docking studies that revealed two major binding models, which are named “S” (substrate) and “I” (inhibitor). In the “S” mode the carbonyl group of  $\beta$ -lactam ring is coordinated to ZnI and the carboxylate/nitrogen with Zn2, the hydroxide is favourably positioned for nucleophilic attack on the carbonyl carbon. The “I” mode, which contains the carboxyl group coordinating with ZnI and Zn2 relocating the hydroxide ion, and the amide group is moved away from the metal ions, avoiding hydrolysis. Most of the active substrates bind in the “S” mode, while monobactams are not hydrolysed by MBL, since they are mainly found in the “I” mode.<sup>9</sup>

As previously reported, the B2 sub-family enzymes are only catalytically active when only one zinc ion is present in the active site (ZnI). In this case the zinc ion at ZnI coordinates with the carbonyl group of the substrate and a water molecule, deprotonated by Asp 120 residue, attacks the electrophilic carbon, forming a negatively charged tetrahedral intermediate. The cleavage of the  $\beta$ -lactam ring and the following dissociation of the product from the enzyme occurs when the Asp 120 residue donates a proton to the nitrogen (Figure 7).<sup>14,27,30</sup>

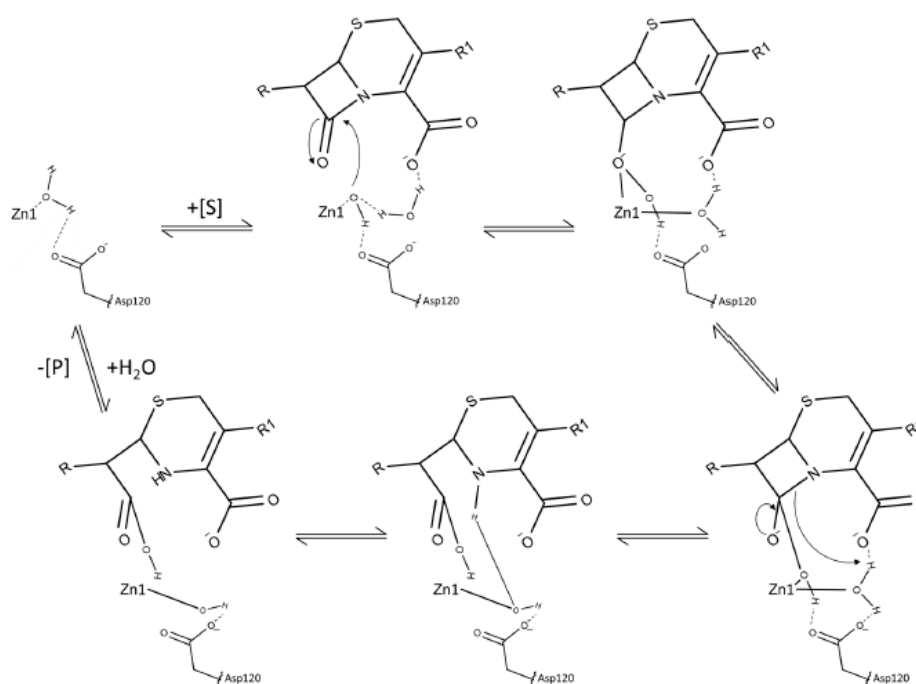


Figure 7. Proposed catalytic mechanism of monozinc MBL. Adapted from Crowder, 2006.<sup>27</sup>

## Metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors

Currently, there are no clinically available inhibitors to block the MBL action.<sup>31</sup> These enzymes have a broad spectrum of action, they exhibit significant structural differences and new  $\beta$ -lactamases often appear and are easily spread among different bacteria, the combination of these characteristics is responsible for the difficult task which is the design of a common inhibitor.<sup>9,32</sup> To be clinically useful, an inhibitor should be active against all three sub-families of the MBL.

The inhibitors clinically used now are only effective against SBL, so there is a clear need to develop MBL inhibitors. Diverse studies show the interest and the effort of the scientific community to find some potentially good candidates.<sup>2,4,18,33</sup> In this work, it will only be addressed the possible inhibitors of the BI metallo- $\beta$ -lactamase imipenemase, more specifically IMP-I.

The imipenemase (IMP) represents a group of IMP-like enzymes with remarkably similar hydrolytic activities, divided in several subgroups, where the percentage of amino acid identity ranges from 90 to 99%.<sup>34</sup>

The IMP-I was first isolated from *Pseudomonas aeruginosa*, in Japan, and since then it has been identified in many other pathogenic species.<sup>34</sup> Research shows that this enzyme is encoded in the plasmids as well as in the integrons, which are highly mobile genetic elements, so this can explain the rapid spread of IMP-I among pathogenic bacteria.<sup>9,34</sup>

To this date, several chemical families have been described as having some inhibitory activity against the MBLs, the most commonly reported were molecules with zinc-binding sulfur.<sup>35-40</sup>

## Sulfur containing compounds

Efforts to identify inhibitors of MBL have revealed several compound classes with promising activities, including sulfur-containing small molecules with a free thiol or a sulfur atom present in a heterocycle. Following a typical approach, thiol groups can coordinate with the zinc ions so they appear to be the most promising in terms of affinity. However, it is important to note that this strategy can only have clinical application if the compound is highly MBL specific, this means that it cannot inhibit the human metallo-enzymes.<sup>26,35,36,41</sup>

In the literature, structure as mercaptoacetic acid (Figure 8) and mercaptoproionic acid are described as effective inhibitors of IMP-I enzyme.<sup>42</sup> Additional studies, conducted by Hammond and his team allowed to identify higher analogs of mercapto-carboxylic acids including 2-arylmethyl-2-mercaptoacetic acids and their thioesters as potent MBL inhibitors.<sup>43</sup>

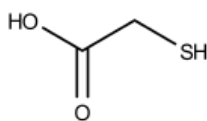


Figure 8. Mercaptoacetic acid. Adapted from Arakawa *et al*, 2000.<sup>42</sup>

Mollard *et al.*, reported that thiomandalic acid (Figure 9) showed to be a broad-spectrum inhibitor of different MBLs, with sub-micromolar  $K_i$  value for the nine MBL tested.<sup>44</sup>



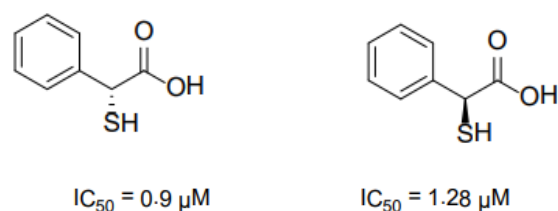


Figure 9. Thiomandelic acid. Adapted from Mollard *et al.*, 2001.<sup>44</sup>

Kurosaki *et al.*, described two irreversible inhibitors 7 and 8 (Figure 10) with  $K_i$  values of  $3.452 \pm 0.030 \mu\text{M}$  and  $0.423 \pm 0.013 \mu\text{M}$ , respectively for the IMP-I enzyme.<sup>45</sup>

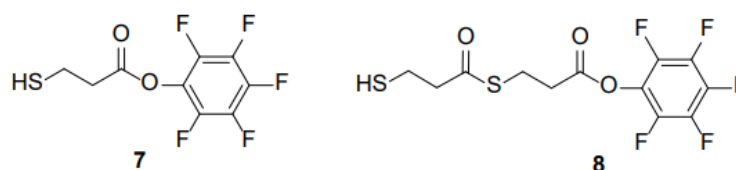


Figure 10. Irreversible inhibitors for IMP-I enzyme. Adapted from Kurosaki *et al.*, 2005.<sup>45</sup>

During the search for effective inhibitors to all three sub-families of MBL, Liénard *et al.*, synthesized several compounds with thiol functions. Compound 12 and 13 (Figure 11) showed inhibitory activity against all three subclasses.<sup>46</sup>

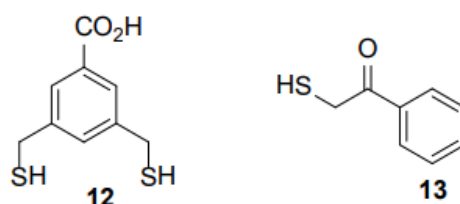


Figure 11. Effective inhibitors against all three sub-families of MBL. Adapted from Liénard *et al.*, 2008.<sup>46</sup>

Lassaux *et al.*, synthesized mercaptophosphonate compounds and then screened them against all sub-families of MBL, with few exceptions, most of the compounds were found to be competitive inhibitors of all MBL. The compound presented below (Figure 12) showed to be the compound with the most potent broad-spectrum of action.<sup>47</sup>

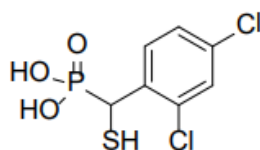


Figure 12. Potent broad-spectrum inhibitor. Adapted from Lassaux *et al.*, 2010.<sup>47</sup>

Jin and his co-workers, determined the inhibitory activity of two series of compounds, 2-w-phenylalkyl-3-mercaptopropionic acids and N-[87-chloro-quinolin-4-ylamino)-alkyl]-3-mercapto-propion-amides, on IMP-I. In the first series, PhenylC4SH showed potent inhibitory activity against IMP-I ( $IC_{50}=1.2 \mu\text{M}$ ), where in the second series, QuimolineC4SH exhibited maximum inhibitory activity for the IMP-I-enzymes ( $IC_{50}=2.4 \mu\text{M}$ ).<sup>48</sup>(Figure 13)

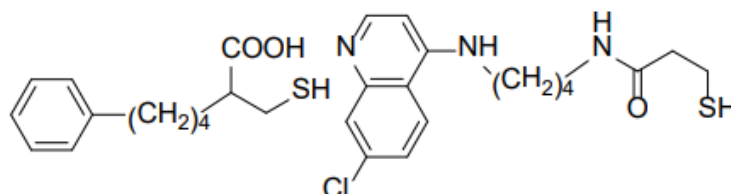


Figure 13. PhenylC4SH (left) and QuimolineC4SH (right). Adapted from Jin *et al.*, 2004.<sup>48</sup>

Concha *et al.*, discovered that mercaptocarboxylate (Figure 14) inhibits the IMP-I with  $IC_{50}$  values between 100 and 500 nM, after the characterization of the crystal structure of the complex IMP-I- mercaptocarboxylate.<sup>26</sup>

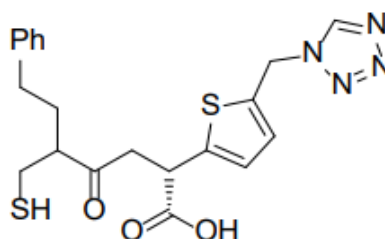


Figure 14. Mercaptocarboxylate. Adapted from Concha *et al.*, 2000.<sup>26</sup>

Vella *et al.*, screened a 500 compound Maybridge library to find new classes of leading inhibitors against IMP-I, the 4-methyl-5-(trifluoromethyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol (Figure 15) with  $K_i=0.97 \pm 0.60 \text{ mM}$  was considered the most interesting for additional study.<sup>49</sup>

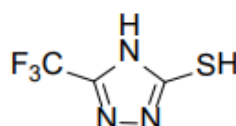


Figure 15. 4-methyl-5- (trifluoromethyl)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol. Adapted from Vella *et al.*, 2011.<sup>49</sup>

Faridoon and his group created a ring system to increase the effectiveness of this compound and discovered that mercapto triazole (Figure 16) exhibits mixed inhibitory activity ( $K_i$  competitive =  $75 \pm 30 \mu\text{M}$  and  $K_i$  uncompetitive =  $56 \pm 10 \mu\text{M}$ ) for the IMP-I.<sup>50</sup>

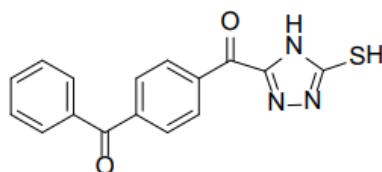


Figure 16. Mercapto triazole. Adapted from Faridoon *et al.*, 2012.<sup>50</sup>

Furthermore, they found that the N-acylated thiosemicarbazide (Figure 17) in the synthesis of mercapto triazoles exhibit inhibitory activity against IMP-I ( $K_i = 11 \mu\text{M}$ ).<sup>50</sup>

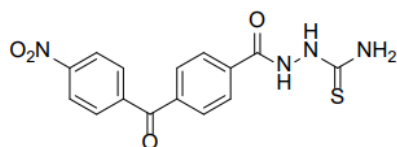


Figure 17. N-acylated thiosemicarbazide. Adapted from Faridoon *et al.*, 2012.<sup>50</sup>

Siemann and his colleagues also studied thiols as standard inhibitors and reported mercaptoacetic acid,  $IC_{50} = 1.3 \mu\text{M}$ , (Figure 8) and 1,2-benzenedimethanethiol,  $IC_{50} = 2.3 \mu\text{M}$ , (Figure 18) as inhibitors of the IMP-I enzyme.<sup>51</sup>

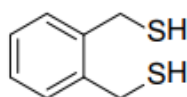


Figure 18. 1,2-benzenedimethanethiol. Adapted from Siemann *et al.*, 2003.<sup>51</sup>

Tehrani *et al.* conducted a series of antibacterial assays to evaluate the synergistic activity of thiol containing small molecules with representative  $\beta$ -lactams meropenem and cefoperazone against diverse Gram-negative bacteria expressing various  $\beta$ -lactamases, including IMP-I. Among the thiols selected, captopril and thiosalicylic acid were commercially available and the others were synthesized via previously reported synthetic routes. This study demonstrated a significant level of synergism between meropenem and thiomandelic acid and 2-merpcto-3-phenylpropionic acid, as the combination of meropenem

with these compounds showed antibacterial activity against several Gram-negative bacteria. However, these compounds can interact with other metallo proteins, which can compromise their activity against MBL.<sup>24</sup>

Sevaille *et al.* explored the potential of the thiazole-thione heterocycle as inhibitor of MBL. They synthesize a series of 54 1,2,4-triazole-3-thione compounds and evaluated their inhibitory activity against clinically-relevant enzymes, such as IMP-I. The results showed that several compounds significantly inhibited the IMP-I and other MBL enzymes, with emphasis on the compound below (Figure 19), that showed IC<sub>50</sub> lower than 50  $\mu$ M toward these enzymes. Additionally, some compounds showed inhibitory activity against mono-zinc MBL, which means that broad range inhibitors could be obtained from heterocycle-thione.<sup>33</sup>

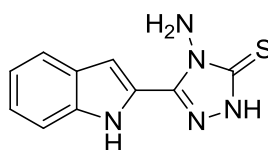


Figure 19 1,2,4-triazole-3-thione. Adapted from Sevaille *et al.*, 2017.<sup>33</sup>

# Discussion

MBL represent a real threat against public health, as they are present in pathogenic bacteria and can hydrolyse all  $\beta$ -lactams. Different scientific groups are working to find a potent inhibitor against these enzymes, however this mission is quite challenging. As described before these enzymes have a broad spectrum of action and significant structural differences, making difficult the rational design of an inhibitor against all three sub-families (B1, B2, B3). Several compounds are described as potential inhibitors of MBL, with special emphasis to the small molecules containing sulfur as well heterocyclic-thiones.<sup>9,24</sup>

The interest for these compounds is justified by their capability to chelate the zinc ions present in the MBLs active site. Compounds like mercaptoacetic acid and mercaptopropionic acid have been identified as showing inhibitory activity against MBL.<sup>24,52,53</sup> Even though, they exhibit inhibitory activity, they can also interact with human metalloproteins, which precludes their use as clinical inhibitors of MBL.

Different authors like Tehrani *et al*<sup>24</sup>., and Seville *et al*<sup>33</sup>., stress the importance of the optimization of analogues to overcome the problem of specificity, since a perfect inhibitor should be active against all sub-families of MBL while avoiding inhibition of human metalloproteins. From the possible inhibitors shown herein, several will continue to be studied in different assays with the aim to find the one than presents all the necessary characteristics to become a therapeutic solution.

# Conclusion

Antibiotic resistance is a global hazard, responsible for over 25.000 deaths every year just in European Union.<sup>16</sup> The incorrect use of the antibiotics as well as the constant evolution of bacteria led us to the present situation. Nosocomial infections are becoming more common, and riskier because of the multidrug resistant bacteria. A new family of BL has received prominence, the MBL, a new threat that quickly spread worldwide. With the emergence of these enzymes it was possible to understand that there is a gap in the antibacterial drugs available, and there is also a lack of inhibitors for these enzymes. All around the world, investigators are trying to identify an effective inhibitor against MBL but unfortunately until this date, there is no inhibitor clinically available. Presently, this field of scientific research is full of possibilities and we can only hope for a major break-through that will help us fight antibiotic resistance.

# Parte II - Relatório de Estágio de Farmácia Comunitária

# Resumo

O relatório do estágio em farmácia comunitária foi escrito de acordo com o exigido em forma de uma análise SWOT fundamentada, tal como indicado nas Normas orientadoras. O estágio foi realizado nas Caldas da Rainha, de janeiro a abril. Neste período tive a oportunidade de acompanhar o trabalho realizado na farmácia, seja ao nível da receção de encomendas, como o atendimento ao público, bem como nas decisões de organização e gestão.

Palavras-chave: Farmácia, análise SWOT, medicamentos, receitas médicas.



# Abstract

The report on my internship at a Community Pharmacy was written in the form of a SWOT analysis, as indicated in the Guidelines. It took place in Caldas da Rainha, from January to April. In this period, I had the opportunity to follow the work carried out in the pharmacy. This included receiving orders, providing pharmaceutical care and help to the public, and participating in decisions of organization and management.

Keywords: pharmacy, SOWT analysis, drugs, medical prescriptions.

# Introdução

O estágio curricular em farmácia comunitária teve a duração de mais de 648 horas, em conformidade com as normas do curso.

A Farmácia Central das Caldas da Rainha é uma das farmácias mais antigas da cidade, contando já com mais de 100 anos de história. É um estabelecimento que transmite confiança, apresenta uma equipa estável, bem-disposta e que conta com um elevado número de utentes fidelizados.

A escolha desta farmácia para a realização do estágio é principalmente fundamentada na experiência positiva que tive quando realizei lá o estágio de verão em 2016. Quando abordei a diretora técnica, a doutora Margarida Galamba, sobre a possibilidade da realização do estágio curricular na sua farmácia, ela mostrou grande disponibilidade e entusiasmo em receber-me e foi sempre muito flexível em relação as datas do início do estágio e ao horário.

Nesta farmácia eu era a única estagiária e a equipa é constituída por duas farmacêuticas, incluindo a diretora técnica e três técnicos de farmácia.

Como anteriormente realizei lá o estágio de verão, durante o qual estive mais envolvida na parte da receção das encomendas, reposição dos lineares e arrumação dos medicamentos, comecei o estágio curricular logo no atendimento ao público, acompanhada pela farmacêutica Ana Flório. A doutora Ana teve o cuidado de transmitir-me informação sobre os diferentes grupos terapêuticos dos medicamentos não sujeitos a receita médica bem como sobre os produtos de dermocosmética/dermofarmácia, o que permitiu-me adquirir conhecimentos para fazer aconselhamentos de uma forma segura. Senti-me muito apoiada na farmácia e à vontade para fazer perguntas a qualquer elemento da equipa.

Com a realização deste estágio tive a possibilidade de contactar com uma diversidade de utentes, participar em diferentes formações e atividades desenvolvidas na própria farmácia bem com solidificar os conhecimentos prévios e adquirir outros.

O relatório de estágio foi escrito em formato de análise SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*, onde abordo as Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças, que considero que estão relacionados com a farmácia em si, bem como comigo.

# Strenghts - Forças

## Conhecimentos prévios

Considero que durante o curso somos muito bem preparados para a farmácia comunitária, senti-me confiante na dispensa e aconselhamento dos medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM).

Em relação aos medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), senti que já tinha alguns conhecimentos, mas como parte da aprendizagem no meu estágio, logo início, foram-me explicados os diferentes grupos de medicamentos consoante as patologias e os devidos aconselhamentos e cuidados que devia ter na hora da dispensa.

Na faculdade também aprendemos os conceitos de *cross selling* e *up selling*, pelo que foi muito interessante colocá-los na prática durante os atendimentos.

## Realização prévia do estágio de verão

A realização na mesma farmácia do estágio de verão e do estágio curricular, permitiu-me conhecer com antecedência a equipa, a organização da farmácia, pelo que me senti muito à vontade quando comecei o estágio em janeiro. Como no estágio de verão estive praticamente só a rececionar encomendas e a arrumar os lineares, logo desde do primeiro dia do estágio curricular estive no atendimento ao público, o que considero que foi uma mais valia, porque sendo que o meu estágio foi só de quatro meses consegui aproveitar mais para aperfeiçoar o atendimento ao público.

## Fidelização de utentes

A farmácia conta com um elevado número de utentes fidelizados, que frequentam o estabelecimento há muitos anos e conhecem muito bem a equipa. Como eu era um elemento novo na equipa senti precisava de ganhar a confiança deles para que quisessem ser atendidos por mim e durante este processo tive sempre o apoio da equipa que assegurava as pessoas que estava mais do que capaz de realizar o atendimento.

### Conhecimento de diferentes línguas

A capacidade de falar várias línguas é realmente uma mais valia na farmácia comunitária, durante este período de tempo atendi vários turistas e por conseguir comunicar com eles, conseguia fazer devidamente o aconselhamento.

### A equipa

Um dos pontos que mais quero destacar como uma mais valia da minha experiência, é a realmente a equipa, eles foram incansáveis, estavam sempre prontos a ajudar e o ambiente em geral na farmácia é fantástico.

São pessoas que estão recetivas a novas ideias, trataram-me como um membro da equipa, senti-me sempre integrada e à vontade para fazer perguntas, sugestões e observar e aprender com o trabalho deles.

### A localização

A farmácia central localiza-se no centro da cidade, mesmo em frente a praça da fruta, que é uma zona muito movimentada pelo que costuma ter sempre movimento e pude interagir com diferentes tipos de utentes, desde mais jovens aos mais idosos, os utentes fidelizados e muitos turistas.

### Técnicas de análise e monitorização de parâmetros bioquímicos e tensão arterial

A farmácia dispõe de serviços de medição da tensão arterial, glicémia e colesterol total. Durante o estágio tive a oportunidade de realizar estes serviços várias vezes, o que permitiu que o atendimento ao público fluísse de uma forma ordenada já que tinha autonomia suficiente para fazer este trabalho sozinha.

# Wicknesses - Fraquezas

## Tamanho da farmácia

A Farmácia Central localiza-se na zona antiga da cidade, ao longo dos anos foi alvo de remodelações e de aumento de dimensões contudo o espaço atual continua a ser demasiado pequeno para permitir a existência de outros tipos de serviços e produtos, como por exemplo produtos de ortopedia, que têm uma grande procura, uma maior variedade de linhas de produtos cosméticos e mais espaço para a arrumação, já que este tem de ser muito bem gerido por causa das encomendas.

## Aconselhamento farmacêutico

Existiram várias áreas em que senti que não estava à vontade para fazer o aconselhamento, nomeadamente nos produtos para bebés e recém mães, na área veterinária e nos produtos de dermocosmética/dermofarmácia. Pelo que me foi realizada uma exposição maior sobre esses produtos pela doutora Ana e nos momentos em que senti mais dificuldades pedia ajuda a algum elemento da equipa.

## Falta de acompanhamento personalizado

A grande maioria de utentes que são atendidos são idosos, que normalmente tomam um número significativo de medicamentos por dia. Assim, seria uma mais valia se na farmácia existisse um seguimento destes utentes e da medicação que tomam de forma a facilitar o correto aconselhamento farmacêutico, a identificação de reações adversas e criação de técnicas para ajudar aqueles que têm dificuldades em lembra-se de tomar os medicamentos nas horas corretas.

Igualmente poderiam ser criadas alguma técnica para ajudar as pessoas com mais dificuldades em ler para que tomem os medicamentos corretos nas horas corretas, já que muitas das vezes as pessoas relacionam os medicamentos que tomam com as embalagens secundárias e a dispensa do mesmo medicamento, mas de laboratório diferente pode criar-lhes confusão.

# Opportunities - Oportunidades

## Aprofundar e aumentar conhecimentos

Durante o estágio consegui solidificar os conhecimentos que adquiri nas aulas teóricas e colocá-los em prática. Além disso, tive a oportunidade de participar em diferentes formações internas, como por exemplo sobre produtos Mylan para a obstipação, Daflon<sup>®</sup>, Nadiclox<sup>®</sup>, emplastro de eletroterapia da Urgo, produtos da Reckitt, como Gaviscon<sup>®</sup> e Optrex<sup>®</sup> o que permitiu-me ficar a saber mais sobre alguns produtos que já conhecia bem e ganhar conhecimentos sobre os que até aquele momento desconhecia.

## Dinamização da farmácia

Tive a oportunidade de participar em diferentes atividades de dinamização na farmácia, particularmente na celebração do dia da mulher, em que tive a tarefa de criar folhetos que foram distribuídos na farmácia. Também participei no desenvolvimento das atividades para celebrar o dia do pai e na organização do rastreio capilar.

## Trabalhar com o Sifarma2000<sup>®</sup>

Inicialmente foi difícil aprender a trabalhar com o programa, mas rapidamente com a prática consegui habituar-me e considero que o programa é uma mais valia, já que permite procurar informação com relativa facilidade e ajuda-nos a responder a questões que são colocadas durante o atendimento. Permite identificar erros no aviamento e corrigir qualquer falha que tenha sido cometida.

## Receituário

Todos os dias organizava e corrigia as receitas do dia anterior. Tendo em conta que atualmente o número de receitas manuais é drasticamente menor, devido a existência das receitas eletrónicas, esta tarefa foi muito vantajosa para relembrar os pontos obrigatórios que devem existir numa receita manual, quando é corretamente passada. Assim, quando fazia o aviamento na presença de uma receita, conseguia rapidamente identificar se a receita estava ou não bem passada.<sup>54</sup>

No início do novo mês tive a oportunidade de acompanhar o processo dos fechos dos lotes e o envio das receitas para diferentes organismos, como o INFARMED e as companhias de seguros.

### Manipulados

Na farmácia tive a oportunidade de assistir à preparação de vários manipulados<sup>55</sup>, como solução de ácido bórico à saturação e ainda tive a oportunidade de realizar preparação de manipulado, bem como preencher as fichas necessárias sobre a preparação e calcular os preços<sup>56</sup>.

### Única estagiária

Durante o período de estágio era a única estagiária na farmácia, pelo que fui muito acompanhada por toda a equipa e tive a oportunidade de seguir o trabalho de cada um dos colaboradores.

### Acordos com a farmácia

A Farmácia Central tem um acordo com a Santa Casa da Misericórdia e lares em relação a dispensa dos medicamentos para estes estabelecimentos. Nos dias em que recebíamos as receitas destes estabelecimentos trabalhávamos contra o relógio para conseguirmos fazer o aviamento de todas. No caso da Santa Casa da Misericórdia, ainda tive a oportunidade de acompanhar um elemento da equipa para arrumar os medicamentos dos diferentes utentes presencialmente na enfermaria deles.

# Threats - Ameaças

## Outras farmácias

O mundo farmacêutico é extremamente competitivo, pelo que a presença de mais duas farmácias nas proximidades da Farmácia Central claramente representa uma ameaça. Para além disso, várias farmácias já fizeram contrapropostas aos estabelecimentos com os quais a Farmácia Central tem acordo, com o objetivo de ficarem responsáveis pelo aviamento dos medicamentos para esses locais.

## Falta de estacionamento

Como não existem lugares de estacionamento específicos para as pessoas que vão à farmácia, algumas optam para ir a outras farmácias, enquanto outras fazem uma certa pressão para fazermos o aviamento das receitas o mais rápido possível para não serem multados.

## Receitas manuais

Analisar receitas manuais foi um grande desafio. A dispensa de medicamentos através de uma receita manual é muito propensa a erros e tive sempre o cuidado de mostrar as receitas a outros elementos da equipa para confirmar se estava a interpretar bem, além disso as receitas manuais exigem cuidados extras, já que temos de inserir manualmente os planos e as portarias.

## Comparticipação do estado vs tempo de espera consultas/receitas

Uma grande parte da população portuguesa toma medicação cronicamente, seja para diabetes, hipertensão ou outras patologias.

Muitos destes utentes dirigem-se à farmácia para comprar a sua medicação, e fazem-no com a intenção de não trazer receita médica, pois afirmam não compensar o tempo e o dinheiro perdido numa consulta médica. Isto poderá criar um conflito e um hábito de dispensa de MSRM sem receita médica.



Adicionalmente, nota-se que as pessoas têm dificuldade em perceber que há que medicamentos que não são comparticipados pelo estado, mas mesmo assim são sujeitos a receita médica, pelo que têm uma grande tendência de pedi-los sem receita médica.

### Cartão Saúde

A existência do cartão saúde nas farmácias portuguesas inicialmente poderia apresentar a vantagem de fidelizar os utentes a uma determinada farmácia, contudo a verdade é que as pessoas ficam muito fixadas nos pontos que vão acumulando e tive vários utentes que vinham todos os dias à farmácia só para ganhar o ponto.

Além disso, várias vezes o sistema bloqueava, pelo que não conseguíamos ver os pontos que os utentes tinham, nem fazer qualquer rebate. No final, a farmácia ficava sempre a perder dinheiro.

# Conclusão

A realização do estágio curricular em farmácia comunitária simboliza o final do nosso curso. Durante quatro anos e meio somos preparados para sermos os melhores profissionais de saúde que conseguirmos e o nosso primeiro grande teste é o estágio na farmácia.

Diariamente convivemos com diferentes pessoas, que apresentam diferentes patologias, constantemente tentámos adaptar o nosso discurso, a nossa forma de estar e de falar para conseguirmos passar corretamente a informação e proporcionar os devidos cuidados farmacêuticos aos nossos utentes.

Na farmácia Central, aprendi que é preciso ter muita paciência, é preciso respirar fundo várias vezes, é preciso dar palavras de conforto, saber escutar e mostra que estamos lá para apoiar, mas também é preciso sorrir, ter uma boa disposição e muita força de vontade.

Nesta farmácia tive o meu primeiro contato com o mundo farmacêutico e estou profundamente grata por todos os ensinamentos e toda a ajuda que recebi da equipa. Sinto que nos meses que passei lá, cresci não só em termos profissionais, mas também pessoais, que saí de lá uma pessoa muito mais rica.

Este estágio permitiu consolidar os meus conhecimentos e adquirir outros que foram transmitidos tanto pelos elementos da equipa bem como pelas formações às quais tive oportunidade de assistir.

Ao longo dos meses do estágio notei uma diferença na minha forma de fazer o atendimento ao público, notei que estava mais confiante, mais à vontade para falar com os utentes e que conseguia fazer o atendimento de uma forma mais segura.

Futuramente, espero que todas as farmácias possam oferecer serviços de acompanhamento farmacoterapêutico personalizado e revisão de medicação, que continue a existir uma procura pela inovação e valorização da profissão e que as farmácias continuem a ser um lugar onde são prestados os melhores cuidados farmacêuticos.

# Part III - Relatório do estágio na Indústria Farmacêutica

# Resumo

O estágio em Indústria Farmacêutica foi realizado em Lisboa, nos Laboratórios Expanscience, de maio em julho. Durante este período de tempo tive oportunidade de acompanhar o trabalho desenvolvido na área dos assuntos regulamentares bem como no marketing. O relatório do estágio foi escrito de acordo com o exigido nas Normas orientadoras, em forma de uma análise SWOT fundamentada.

Palavras-chave: Indústria Farmacêutica, Laboratórios Expanscience®, Mustela®, assuntos regulamentares, *marketing*.

# Abstract

The Pharmaceutical Industry internship report follows a SWOT structure, as required in the Guidelines. It took place in Lisbon, from May to July. In this period, I had the opportunity to follow the work carried out at the Expanscience Laboratories, focusing on regulatory issues and marketing.

Keywords: Pharmaceutical Industry, Laboratory Expanscience, Mustela, regulatory affairs, marketing.

# Introdução

Os Laboratórios Expanscience (LE), fundados em 1950, são uma empresa independente francesa, que atua no campo do medicamento e da dermocosmética. A sua sede industrial localiza-se em Épernon, onde são realizadas todas as atividades de investigação e produção.

Há mais de 60 anos que esta empresa se dedica a desenvolver e a fabricar produtos inovadores na área da reumatologia/osteoartrite e saúde da pele. Atualmente apresenta duas marcas líderes - Mustela® e Piascledine 300® e também está intrinsecamente envolvida no desenvolvimento e comercialização de ativos de origem natural destinados à indústria cosmética.

Até à data os LE contam com 16 filiais e 102 países distribuidores pelo mundo. A filial portuguesa existe desde 1977 e está localizada numa zona privilegiada de Lisboa.

Em Portugal apenas são comercializados os produtos Mustela®, contudo os LE também são responsáveis pela distribuição em território Nacional e Internacional (Angola e Moçambique) de outros produtos, sejam cosméticos, medicamentos, dispositivos médicos e leites, produzidos por outros laboratórios, como os Laboratórios Aseptia e Laboratórios Bateau.

Guiando-se por uma política de responsabilidade social, os LE e as suas marcas contribuem para o bem-estar e promoção da saúde da comunidade através do *Better Living Program*. O presidente dos LE, Jean-Paul Berthomé afirmou que “Inovar para propor continuamente soluções eficazes e seguras, respeitando o ser humano e o meio ambiente, permitindo preservar o capital de saúde de cada um nos campos da artrose e da pele, é essa a missão que orienta cada colaborador.” Esta missão une todos os colaboradores numa contínua partilha de competências e valores, com um objetivo comum para o futuro da empresa.<sup>57</sup>

O presente relatório diz respeito a uma análise SWOT, onde abordo as Forças, Fraquezas, Oportunidades e Ameaças do estágio realizado na área dos Assuntos Regulamentares e *Marketing* no âmbito do estágio curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF)

# Strengths - Forças

## Conhecimentos prévios

O estágio nos LE envolveu o departamento dos assuntos regulamentares e de marketing. Durante o nosso curso temos cadeiras que nos dão a conhecer algumas noções nestes campos, pelo que senti que já tinha algumas bases que me permitiram entender mais rapidamente toda a burocracia envolvida bem como os objetivos das campanhas de marketing e o porquê de optar-se por uma específica campanha em determinada altura.

Além disso, tratando-se de uma empresa com uma grande componente de produtos cosméticos, considero que a cadeira de Dermofarmácia/dermocosmética foi essencial, já que que nos prepara para o mundo dos cosméticos. Nas aulas estudamos a legislação referente aos produtos cosméticos, pelo que já alguns conhecimentos que ajudar-me na realização de tarefas que serão mencionadas posteriormente.

## Qualidade e variedade de produtos

Nestes meses de estágio tive a oportunidade de contactar com uma grande variedade de produtos, sejam medicamentos, PC, dispositivos médicos, biocidas, muitos dos quais ainda não conhecia. Tal como referido anteriormente, os LE são responsáveis pela comercialização dos produtos Mustela®, Bébé e Maternidade, em Portugal, mas também fazem a distribuição de vários produtos de outros laboratórios.

Ao estar envolvida tanto nos AR como na área do *Marketing*, trabalhei de perto com os diferentes produtos, fiquei a conhecer as suas características e graças a esta variedade de tipos de produtos pude observar as diferenças que existem relativamente a legislação e a forma de atuar, o que tornou o meu estágio muito mais completo.

## Visão global, bom-ambiente e confiança

Notei que existia uma grande preocupação em transmitir-me uma visão geral de todo o trabalho que é desenvolvido na filial. Os grandes focos do estágio foram as áreas dos AR e do *Marketing*, mas também deram a conhecer o trabalho desenvolvido pelos outros colaboradores, sejam da área administrativa e financeira, apoio ao cliente, da parte comercial.

O bom-ambiente que existe no escritório e entre todos os colaboradores dos LE facilita a comunicação e a troca de ideias, pelo que me senti sempre à vontade para pedir ajuda ou esclarecer qualquer dúvida, o que tornou a minha adaptação muito mais fácil.

Todas as tarefas que tinha para realizar eram feitas de uma forma autónoma, apenas tinha de mostrar o resultado final e corrigir qualquer erro que podia existir, pelo que senti que confiavam na minha forma de trabalhar e nas minhas ideias.

### Diversidade de tarefas

O grande desafio, que também é a grande vantagem, deste estágio é conseguir acompanhar o ritmo de trabalho e estar preparado para os imprevistos e a grande variedade de tarefas que têm de ser executadas. Durante o estágio realizei inúmeras tarefas que permitiram expandir os meus conhecimentos e tornar a minha formação mais completa. Passo a mencionar algumas das tarefas que executei:

**Compilar informação sobre os produtos concorrentes** – conhecer o mercado e os produtos concorrentes que existem disponíveis, bem como os pontos fracos desses produtos é essencial para a criação de forte estratégia de Marketing. Assim, várias vezes realizei pesquisa sobre os produtos concorrentes, sobre os ingredientes presentes, os preços praticados bem como os *claims* presentes nas embalagens.

**Avaliação da conformidade dos produtos** – Uma das responsabilidades dos LE é conferir a embalagem e a rotulagem dos produtos. Visto que os produtos são fabricados em França, esta atividade permite garantir que os produtos se encontram em conformidade com a legislação e com o que foi acordado. Assim, contatei com dois procedimentos internos: Libertação de BAT e Libertação de Lotes. O procedimento da Libertação de BAT é aplicado quando existe um novo produto que vai entrar no mercado nacional ou quando há alguma alteração na rotulagem ou no folheto informativo, neste caso o objetivo é comparar a rotulagem e o FI do produto recebido com a última versão do BAT disponível, para verificar se está tudo em conformidade. Já a Libertação dos Lotes é realizada após a chegada dos produtos à Dilofar, que está encarregue de mandar um exemplar de cada produto para o escritório. Neste caso, verifica-se se a rotulagem está de acordo com o que foi aprovado anteriormente internamente bem como, com a legislação em vigor. Graças a estas tarefas tive um maior conhecimento da legislação aplicada aos produtos cosméticos, nomeadamente



o Regulamento (CE) N.º 1223/2009<sup>58</sup>, da Comissão, e o Decreto-Lei n.º 189/2008<sup>59</sup>, e aos dispositivos médicos, nomeadamente o Decreto-Lei n.º 145/2009<sup>60</sup>.

*Reclamações de qualidade, Cosmetovigilância, Vigilância de DM e Farmacovigilância –*  
A existência de procedimentos específicos para cada uma das situações é essencial para salvaguardar os consumidores e permitir uma rápida reação por parte da empresa. O departamento dos AR está encarregue de assegurar a implementação e a correta realização destes procedimentos. A informação pode chegar de diferentes formas aos LE, pode partir dos consumidores, das farmácias, da Dilofar ou até mesmo dos próprios colaboradores. Consideram-se reclamações de qualidade, quando o produto apresenta alguma inconformidade, seja alteração do cheiro, cor, sendo que estas reclamações são as mais comuns. No caso de existir alguma reação adversa ao produto, passa-se para a área da cosmetovigilância ou vigilância de DM, se se tratar de uma PC ou DM respetivamente. Em ambos os casos é necessário recolher um conjunto de informações, como o nome e contato do reclamante, a validade e lote do produto bem como uma descrição exaustiva da situação, podendo algumas pessoas até terem fotografias que podem ser apresentadas. É também extramente importante tentar fazer chegar o produto em questão aos escritórios, para que seja enviado para França para a realização de análises que permita obter uma justificação para o sucedido. Este trabalho foi muito enriquecedor, visto tinha oportunidade de contactar diretamente com os consumidores e as farmácias, bem como estava responsável por gerir algumas fases do processo e resolver diretamente as situações mais simples.

*Levantamento de todos os DM comercializados pelos LE –* este foi um trabalho bastante exaustivo, tive de compilar num ficheiro Excel informações sobre todos os DM comercializados/distribuídos pelos LE, incluindo os CNPs, a descrição, classe de DM. Com a realização desta tarefa tive a possibilidade de contactar com a página do INFARMED, onde estão notificados todos os DM, bem como ainda pude criar novas notificações de DM que passaram a ser distribuídos pelos LE.

*Facebook –* Por motivos de força maior, durante o mês de julho fiquei responsável pela gestão das páginas oficiais da Mustela<sup>®</sup>, Akileine<sup>®</sup> e Ecrinal<sup>®</sup>. Esta tarefa consistia em responder às questões das consumidoras, fossem dúvidas específicas sobre produtos, ou questão de onde poderiam encontrar determinado produto ou promoção, gerir os vencedores dos diferentes passatempos e enviar os prémios, bem como as amostras que eram pedidas e enviá-las. Tendo em conta que vivemos num mundo cada vez mais digital, em

que parece que as pessoas já não conseguem passar sem as redes sociais, senti uma grande responsabilidade, já que tinha de ter sempre muita atenção à forma como respondia e muito cuidado quando lidava com pessoas mais complicadas, para garantir a ausência de mal-entendidos. Felizmente, tive todo o apoio da equipa, muitas vezes quando tinha dúvidas se devia responder de determinada forma pedia a opinião deles e no final correu tudo muito bem.

**Rebate dos pontos Cartão Mustela** – Existe um Cartão Mustela virtual, que permite acumular pontos com base nos produtos Mustela® que são adquiridos nas farmácias e parafarmácias. O procedimento para o rebate dos pontos funciona da seguinte forma: quando a consumidora tem pontos suficientes para fazer um rebate, pode fazê-lo online, sendo que é lhe emitido um voucher que vai trocar pelo produto nas farmácias ou parafarmácias. Posteriormente, chega aos LE uma lista com todos os rebates realizados, o nome do estabelecimento e o produto que deve ser enviado. Uma das minhas tarefas consistia em fazer a reposição às farmácias e parafarmácias desses produtos.<sup>61</sup>

**Proteção de dados** – Tendo em conta a entrada em vigor da nova política de proteção de dados, a empresa passou por algumas mudanças. Estive responsável por estudar o procedimento que é aplicado na filial italiana, com o objetivo de tirarmos algumas ideias que poderiam ser aplicadas em Portugal, bem como pela gestão das respostas relativamente ao uso dos dados pessoais que já existiam na base de dados.<sup>62</sup>

## *Weaknesses* - Fraquezas

### Presença de duas estagiárias em simultâneo

O escritório não está preparado para receber duas estagiárias ao mesmo tempo, quando comecei o estágio não existia um espaço pronto para me receber, sendo que algumas vezes fiquei numa sala à parte o que tornava mais difícil a troca de ideias e a minha inclusão nos assuntos.

Também notei que não tínhamos as mesmas oportunidades, havia uma clara divisão das tarefas, ficávamos responsáveis de executar diferentes tarefas e não tínhamos a possibilidade de estar a par dos assuntos que cada uma estava a tratar.

### Pouco contato com a sede

Tratando-se de uma empresa de origem francesa e em que todo o processo de investigação e produção é desenvolvido em França, não existiu qualquer possibilidade de contatar com essas áreas.

### Pouco contato com medicamentos

Os LE apenas são responsáveis pela distribuição de um único medicamento, Champô Parasidose<sup>®</sup>, que já existe no mercado há algum tempo. Assim, só tive a possibilidade de ver os dossiês para a obtenção da Autorização de Introdução no Mercado (AIM) e praticamente não lidei com a legislação e os procedimentos relativos aos medicamentos.

### Carga de trabalho

A elevada carga de trabalho e o insuficiente número de colaboradores muitas das vezes tornam complicado a realização de todas as tarefas que tinham sido planeadas. Muitas das vezes é necessário recorrer a uma gestão por prioridades, em que primeiramente são tratados os assuntos considerados mais urgentes.

Notei que a minha orientadora tinha sempre uma grande vontade de explicar-me e dar-me a conhecer o trabalho desenvolvido na área dos AR, contudo muitas das vezes as nossas reuniões tinham de ser adiadas ou mais curtas porque surgiam assuntos que requeriam a sua atenção.

## *Opportunities* - Oportunidades

### Visitas com os delegados médicos e *merchandisers*

Com o objetivo de enriquecer o estágio e mostrar a importância do trabalho desenvolvido pelos DIM e *merchandisers*, tive a oportunidade de acompanhar uma DIM e duas *merchandisers* durante o seu dia de trabalho.

Pude assistir a formações para futuras mães e enfermeiras, o que foi deveras interessante porque além de aprender mais sobre os produtos em si, também vi como uma profissional deve adaptar o seu discurso e a sua postura consoante o público alvo.

Nas farmácias, é extremamente importante a organização dos lineares, por forma a torná-los o mais atrativos possível, e este trabalho é da responsabilidade das *merchandisers*.

Foi muito interessante observar o trabalho que fazem, a forma conseguem ter uma visão global de como querem que os produtos estejam organizados, bem como os truques que usam para dar uma maior exposição às marcas que representam.

### Formação para farmacêuticos

Adicionalmente às visitas referidas anteriormente, também tive a oportunidade de participar em formações para farmacêuticos, em que uma das formações ocorreu no horário pós-laboral nos escritórios e a outra numa farmácia durante o horário de serviço. Como estas formações decorreram em ambientes bem distintos, em que a formadora tinha acesso a recursos diferentes, foi interessante ver a forma como abordava os temas e adaptava o seu discurso, com o objetivo de passar toda a informação essencial, consciente de que tinha um tempo limitado para o fazer, especialmente na formação que deu na farmácia.

### Participar em diferentes reuniões

Ao longo do estágio tive oportunidade de participar em diferentes reuniões. Uma das reuniões realizou-se com o responsável da logística, em que o tópico principal era a previsão dos *stocks*, pelo que tive a oportunidade de perceber como são geridos os *stocks* e como antecipam o que vão precisar durante os diferentes ciclos de trabalho. Outra reunião, muito interessa a que assistiu envolveu a AIC, onde foram discutidos vários assuntos pertinentes para a tomada de algumas decisões que poderão afetar o mercado no futuro.

### Criatividade

Durante o estágio também fiquei a conhecer o departamento de comunicação. Além de ficar com uma noção de como funciona o plano de comunicação da empresa e de como toda a estratégia de comunicação é planeada antecipadamente, tive a oportunidade de dar asas a minha criatividade na elaboração de um comunicado de imprensa (PR).

### Soft-skills

Trabalhei maioritariamente num *open space* e apesar de cada pessoa ter as suas tarefas, a verdade é que muitas das vezes trabalhávamos em equipa, pedíamos opinião, conselhos e ajuda uns aos outros.

Neste estágio também é muito saber mexer bem no *Excel* e no *PowerPoint*, aprendi a usar muitas fórmulas e truques que não conhecia. Grande parte do trabalho envolve também troca de *emails* e a utilização dos calendários dos emails, algo que anteriormente nunca tinha usado.

E por fim, várias vezes tive de fazer traduções, tanto para inglês como para português, melhorando assim o meu domínio das diferentes línguas.

## Threats - Ameaças

### Marcas concorrentes

Uma das grandes ameaças na área da cosmética é a presença de várias marcas concorrentes no mercado. Apesar da Mustela® ser líder de mercado nos produtos para bebés várias marcas têm vindo a ganhar território, o que se traduz numa diminuição de consumidores fidelizados. Existem concorrentes para todas as marcas distribuídas pelos LE, o que implica um maior esforço por parte das gestoras de produto, para garantir que os objetivos de venda sejam atingidos.

### Antecipar o mercado

A indústria farmacêutica vive muito da antecipação do mercado. É necessário estudar a evolução e a tendência das vendas antes de tomar qualquer decisão. É claro que este estudo não é muito linear e que algumas vezes podem surgir imprevistos e é preciso saber lidar com eles. Qualquer decisão tomada, está sempre sujeita a um risco.

## Orçamento

No início do ano, é definido um orçamento para todas as atividades que irão ser desenvolvidas. Muitas vezes os colaboradores têm ótimas ideias para dinamizar as vendas dos produtos, contudo não há possibilidade de colocá-las em prática, já que não estão abrangidas pelo orçamento inicial.

## Legislação

A interpretação da legislação sobre os PC e os DM é suscetível a várias dúvidas por parte dos responsáveis pela comercialização dos produtos.

Uma das questões que surgiu em diferentes alturas do meu estágio foi a presença de determinados *claims*, não só nos produtos distribuídos pelos LE, bem como em vários produtos concorrentes que existem no mercado, já que o único suporte legal relacionado com as alegações relativas a PC é o Regulamento (EU) n.º 655/2013 da Comissão<sup>63</sup>, que estabelece critérios comuns para justificar as alegações, tais como a conformidade legal, veracidade, sustentação de prova, honestidade, imparcialidade e tomada de decisão informada. Outra questão que surgiu, foi relativamente a manipulação dos produtos para campanhas promocionais que só estavam em vigor em Portugal, já que não é claro quem pode realizar a manipulação e se necessita de autorização especial.

# Conclusão

A indústria farmacêutica representa todo um mundo de possibilidades, engloba inúmeras áreas onde um farmacêutico pode triunfar e crescer enquanto profissional de saúde.

Este estágio foi sem dúvida uma mais valia para o meu futuro profissional. Acho que a orientadora, Sandra Palma, tem uma perspetiva extremamente interessante daquilo que quer passar durante o estágio. Valorizo o facto de não se focar só na área dos AR e *Marketing*, mas também de tentar passar uma visão global do funcionamento da empresa e dar a oportunidade de acompanhar o trabalho dos outros colaboradores, como os DIM, as *merchandisers*, do *marketing* digital/CRM, entre tantos outros. Além disso, durante o estágio tive a oportunidade de estar envolvida na gestão das reclamações de qualidade, nos processos de cosmetovigilância, pude criar novas notificações no INFARMED, elaborar apresentações em *PowerPoint*, ajudar no envio *press kits*, todo um conjunto de tarefas que permitiu conviver com outros elementos da equipa, comunicar com consumidoras e enriquecer-me profissionalmente.

Considero que a área dos AR é essencial, são necessárias pessoas que dominem esta área, já que nenhuma indústria farmacêutica consegue existir sem este departamento. É verdade que é uma área morosa, é necessária uma constante aprendizagem e atualização em relação à legislação em vigor, envolve muita papelada, mas nunca há um dia igual ao outro.

Terminei o estágio com o sentimento de missão quase cumprida, já que infelizmente não deu tempo para fazer todas as tarefas as quais me propus, confirmado a teoria de que trabalhei por gestão de prioridades e tentei terminar os assuntos mais urgentes.

Estou grata por tudo aquilo que aprendi nestes meses e tenho a certeza de os conhecimentos que adquiri serão úteis e importantes para o meu futuro profissional.

# Referências

1. HUBSCHWERLEN, C. 7.17  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Compr. Med. Chem. II* **7**, (2007) 479–518
2. XIANG, Y., CHANG, Y.-N., GE, Y., KANG, J. S., ZHANG, Y.-L., LIU, X.-L., OELSCHLAEGER, P. and YANG, K.-W. Azolythioacetamides as a potent scaffold for the development of metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, (2017) 5225–5229.
3. SCHILLACI, D., SPANÒ, V., PARRINO, B., CARBONE, A., MONTALBANO, A., BARRAJA, P., DIANA, P., CIRRINCIONE, G. and CASCIOFERRO, S. Pharmaceutical Approaches to Target Antibiotic Resistance Mechanisms. *J. Med. Chem.* **60**, (2017) 8268–8297.
4. MCGEARY, R. P., TAN, D. T. C., SELLECK, C., MONTEIRO PEDROSO, M., SIDJABAT, H. E. and SCHENK, G. Structure-activity relationship study and optimisation of 2-aminopyrrole-1-benzyl-4,5-diphenyl-1 H -pyrrole-3-carbonitrile as a broad spectrum metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor. *Eur. J. Med. Chem.* **137**, (2017) 351–364.
5. VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part I: causes and threats. *P T A peer-reviewed J. Formul. Manag.* **40**, (2015) 277–83.
6. BEBRONE, C., LASSAUX, P., VERCHEVAL, L., SOHIER, J. S., JEHAES, A., SAUVAGE, E. and GALLEN, M. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: Focus on  $\beta$ -lactamase inhibition. *Drugs* **70**, (2010) 651–679.
7. WATKINS, R. R. and BONOMO, R. A.  *$\beta$ -Lactam Antibiotics. Infectious Diseases* (Elsevier Ltd, 2017). doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00140-4.
8. HUBSCHWERLEN, C.  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Compr. Med. Chem. II* (2007) 479–518 doi:10.1016/B0-08-045044-X/00218-2.
9. PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, (2013) 91–104.
10. KHAN, D. A. and SOLENSKY, R. Drug allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, (2010) S126–S137.e1.
11. HOGG, S. *Essential Microbiology*. John Wiles & Sons, Ltd (2005) 51-72.
12. VAN BAMBEKE, F., MINGEOT-LECLERCQ, M.-P., GLUPCZYNSKI, Y. and TULKENS, P. M. Mechanisms of Action. *Infect. Dis. (Auckl)*. (2017) 1162–1180.e1 doi:10.1016/B978-0-7020-6285-8.00137-4.
13. BROWN, L., WOLF, J. M., PRADOS-ROSALES, R. and CASADEVALL, A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, (2015) 620–630.



14. PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1277**, (2013) 91–104.
15. FAIR, R. J. and TOR, Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect. Medicin. Chem.* **6**, (2014) 25–64.
16. WHO | Antimicrobial resistance. WHO (2018). [Acedido a 29 de julho] Disponível na Internet: [www.who.int/abtimicrobial-resistance/en/](http://www.who.int/abtimicrobial-resistance/en/).
17. WORTHINGTON, R. J. and MELANDER, C. Overcoming Resistance to  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *J Org Chem.* **78**, (2013) 4207–4213.
18. BREM, J., VAN BERKEL, S. S., ZOLLMAN, D., LEE, S. Y., GILEADI, O., MCHUGH, P. J., WALSH, T. R., McDONOUGH, M. A. and SCHOFIELD, C. J. Structural Basis of Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibition by Captopril Stereoisomers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**, (2016) 142–150.
19. DRAWZ, S. M. and BONOMO, R. A. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, (2010) 160–201.
20. BUSH, K. and JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, (2010) 969–976.
21. LAMOTTE-BRASSEUR, J., KNOX, J., KELLY, J. A., CHARLIER, P., FONZE, E., DIDEBERG, O. and FRÈRE, J. M. The structures and catalytic mechanisms of active-site serine  $\beta$ -lactamases. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **12**, (1994) 189–230.
22. BEBRONE, C. Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem. Pharmacol.* **74**, (2007) 1686–1701.
23. PAPAGIANNITSIS, C. C., MEDVECKY, M., CHUDEJOVA, K., SKALOVA, A., ROTOVA, V., SPANELOVA, P., JAKUBU, V., ZEMLICKOVA, H. and HRABAK, J. Molecular characterization of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant sequence type 357 expressing IMP-7 metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017).
24. TEHRANI, K. H. M. E. and MARTIN, N. I. Thiol-Containing Metallo- $\beta$ -Lactamase Inhibitors Resensitize Resistant Gram-Negative Bacteria to Meropenem. *ACS Infect. Dis.* **3**, (2017) 711–717.
25. WALSH, T. R., TOLEMAN, M. A., POIREL, L. and NORDMANN, P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, (2005) 306–325.
26. CONCHA, N. O., JANSON, C. A., ROWLING, P., PEARSON, S., CHEEVER, C. A., CLARKE, B. P., LEWIS, C., GALLEN, M., FRÈRE, J. M., PAYNE, D. J., BATESON, J. H. and ABDEL-MEGUID,

- S. S. Crystal structure of the IMP-I metallo  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: Binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry* **39**, (2000) 4288–4298.
27. CROWDER, M. W., SPENCER, J. and VILA, A. J. Metallo- $\beta$ -lactamases: Novel Weaponry for Antibiotic Resistance in Bacteria. *Acc. Chem. Res.* **39**, (2006) 721–728.
  28. WANG, Z., FAST, W. and BENKOVIC, S. J. On the mechanism of the metallo-beta-lactamase from *Bacteroides fragilis*. *Biochemistry* **38**, (1999) 10013–10023.
  29. MOJICA, M. F., BONOMO, R. A. and FAST, W. BI-Metallo- $\beta$ -Lactamases: Where Do We Stand? *Curr. Drug Targets* **17**, (2016) 1029–50.
  30. MEINI, M.-R., LLARRULL, L. I. and VILA, A. J. Overcoming differences: The catalytic mechanism of metallo- $\beta$ -lactamases. *FEBS Lett.* **589**, (2015) 3419–3432.
  31. SPENCER, J., READ, J., SESSIONS, R. B., HOWELL, S., BLACKBURN, G. M. and GAMBLIN, S. J. Antibiotic recognition by binuclear metallo-beta-lactamases revealed by X-ray crystallography. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, (2005) 14439–14444.
  32. SHAPIRO, A. B. Kinetics of sulbactam hydrolysis by  $\beta$ -lactamases, and kinetics of  $\beta$ -lactamase inhibition by sulbactam. *Antimicrob. Agents Chemother.* **61**, (2017) 1–28.
  33. SEVAILLE, L. et al. 1,2,4-Triazole-3-thione Compounds as Inhibitors of Divalent Metallo- $\beta$ -lactamases. *ChemMedChem* **12**, (2017) 972–985.
  34. HONG, D. J., BAE, I. K., JANG, I. H., JEONG, S. H., KANG, H. K. and LEE, K. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Chemother.* **47**, (2015) 81–97.
  35. BUYNAC, J. D.  $\beta$ -Lactamase inhibitors: a review of the patent literature (2010 – 2013). *Expert Opin. Ther. Pat.* **23**, (2013) 1469–1481.
  36. FAST, W. and SUTTON, L. D. Metallo- $\beta$ -lactamase: Inhibitors and reporter substrates. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1834**, (2013) 1648–1659.
  37. CHANG, Y.-N., XIANG, Y., ZHANG, Y.-J., WANG, W.-M., CHEN, C., OELSCHLAEGER, P. and YANG, K.-W. Carbamylmethyl Mercaptoacetate Thioether: A Novel Scaffold for the Development of LI Metallo- $\beta$ -lactamase Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **8**, (2017) 527–532.
  38. SHIN, W. S., BERGSTROM, A., BONOMO, R. A., CROWDER, M. W., MUTHYALA, R. and SHAM, Y. Y. Discovery of 1-Hydroxypyridine-2(1H)-thione-6-carboxylic Acid as a First-in-Class Low-Cytotoxic Nanomolar Metallo  $\beta$ -Lactamase Inhibitor. *ChemMedChem* **12**, (2017) 845–849.
  39. SKAGSETH, S., AKHTER, S., PAULSEN, M. H., MUHAMMAD, Z., LAUKSUND, S., SAMUELSEN,

- Ø., LEIROS, H.-K. S. and BAYER, A. Metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors by bioisosteric replacement: Preparation, activity and binding. *Eur. J. Med. Chem.* **135**, (2017) 159–173
40. SEVAILLE, L. et al. 1,2,4-Triazole-3-thione Compounds as Inhibitors of Zinc Metallo- $\beta$ -lactamases. *ChemMedChem* **12**, (2017) 972–985.
41. FARIDOON. An Update on the Status of Potent Inhibitors of Metallo- $\beta$ -Lactamases. *Sci. Pharm.* **81**, (2013) 309–328.
42. ARAKAWA, Y., SHIBATA, N., SHIBAYAMA, K., KUROKAWA, H., YAGI, T., FUJIWARA, H. and GOTO, M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.* **38**, (2000) 40–3.
43. HAMMOND, G. G., HUBER, J. L., GREENLEE, M. L., LAUB, J. B., YOUNG, K., SILVER, L. L., BALKOVEC, J. M., PRYOR, K. A. D., WU, J. K., LEITING, B., POMPLIANO, D. L. and TONEY, J. H. Inhibition of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase and sensitization of IMP-1-producing bacteria by thioester derivatives. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, (1999) 289–296.
44. MOLLARD, C., MOALI, C., PAPAMICHAEL, C., DAMBLON, C., VESSILIER, S., AMICOSANTE, G., SCHOFIELD, C. J., GALLEN, M., FRERE, J. M. and ROBERTS, G. C. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc beta-lactamases: kinetic and spectroscopic studies. *J. Biol. Chem.* **276**, (2001) 45015–23.
45. KUROSAKI, H., YAMAGUCHI, Y., HIGASHI, T., SOGA, K., MATSUEDA, S., YUMOTO, H., MISUMI, S., YAMAGATA, Y., ARAKAWA, Y. and GOTO, M. Irreversible Inhibition of Metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-1) by 3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl)propionic Acid Pentafluorophenyl Ester. *Angew. Chemie Int. Ed.* **44**, (2005) 3861–3864.
46. LIÉNARD, B. M. R., GARAU, G., HORSFALL, L., KARSISIOTIS, A. I., DAMBLON, C., LASSAUX, P., PAPAMICHAEL, C., ROBERTS, G. C. K., GALLEN, M., DIDEBERG, O., FRÈRE, J.-M. and SCHOFIELD, C. J. Structural basis for the broad-spectrum inhibition of metallo- $\beta$ -lactamases by thiols. *Org. Biomol. Chem.* **6**, (2008) 2282.
47. LASSAUX, P., HAMEL, M., GULEA, M., DELBRÜCK, H., MERCURI, P. S., HORSFALL, L., DEHARENG, D., KUPPER, M., FRÈRE, J.-M., HOFFMANN, K., GALLEN, M. and BEBRONE, C. Mercaptophosphonate Compounds as Broad-Spectrum Inhibitors of the Metallo- $\beta$ -lactamases. *J. Med. Chem.* **53**, (2010) 4862–4876.
48. JIN, W., ARAKAWA, Y., YASUZAWA, H., TAKI, T., HASHIGUCHI, R., MITSUTANI, K., SHOGA, A., YAMAGUCHI, Y., KUROSAKI, H., SHIBATA, N., OHTA, M. and GOTO, M. Comparative Study of the Inhibition of Metallo- $\beta$ -Lactamases (IMP-1 and VIM-2) by Thiol Compounds That Contain a Hydrophobic Group. *Biol. Pharm. Bull.* **27**, (2004) 851–856
49. VELLA, P., HUSSEIN, W. M., LEUNG, E. W. W., CLAYTON, D., OLLIS, D. L., MITIĆ, N.,

- SCHENK, G. and MCGEARY, R. P. The identification of new metallo- $\beta$ -lactamase inhibitor leads from fragment-based screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, (2011) 3282–3285.
50. FARIDON, HUSSEIN, W. M., VELLA, P., ISLAM, N. U., OLLIS, D. L., SCHENK, G. and MCGEARY, R. P. 3-Mercapto-1,2,4-triazoles and N-acylated thiosemicarbazides as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, (2012) 380–386.
51. SIEMANN, S., CLARKE, A. J., VISWANATHA, T. and DMITRIENKO, G. I. Thiols as classical and slow-binding inhibitors of IMP-I and other binuclear metallo- $\beta$ -lactamases. *Biochemistry* **42**, (2003) 1673–1683.
52. MOLLARD, C., MOALI, C., PAPAMICHAEL, C., DAMBLON, C., VESSILIER, S., AMICOSANTE, G., SCHOFIELD, C. J., GALLEN, M., FRÈRE, J. M. and ROBERTS, G. C. K. Thiomandelic acid, a broad spectrum inhibitor of zinc  $\beta$ -lactamases. Kinetic and spectroscopic studies. *J. Biol. Chem.* **276**, (2001) 45015–45023.
53. PAYNE, D. J., BATESON, J. H., GASSON, B. C., PROCTOR, D., KHUSHI, T., FARMER, T. H., TOLSON, D. A., BELL, D., SKETT, P. W., MARSHALL, A. C., REID, R., GHOSEZ, L., COMBRET, Y. and MARCHAND-BRYNAERT, J. Inhibition of metallo-beta-lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, (1997) 135–40.
54. Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde. [Acedido a 23 de janeiro de 2018] Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas\\_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872)
55. Portaria 594/2004, 2004-06-02 - DRE. [Acedido a 9 de março de 2018] Disponível na Internet: [https://dre.pt/pesquisa/-/search/261875/details/maximized?print\\_preview=print-preview](https://dre.pt/pesquisa/-/search/261875/details/maximized?print_preview=print-preview)
56. Portaria 769/2004, 2004-07-01 - DRE. [Acedido a 9 de março de 2018] Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/517633/details/maximized>
57. Laboratoires Expanscience. [Acedido a 16 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://www.expanscience.pt/>
58. REGULAMENTO (CE) N.º 1223/2009 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 30 de Novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos. [Acedido a 7 de junho de 2018] Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:pt:PDF>
59. Decreto-Lei 189/2008, 2008-09-24 - DRE. [Acedido a 23 de junho de 2018] Disponível na Internet <https://dre.pt/pesquisa/-/search/452215/details/maximized>
60. Decreto-Lei 145/2009, 2009-06-17 - DRE. [Acedido a 23 de junho de 2018]

- Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/494558/details/maximized>
61. Cartão de Fidelidade Mustela | MUSTELA. [Acedido a 3 de agosto de 2018]  
Disponível na Internet: <https://www.mustela.pt/content/Cartao-de-Fidelidade-Mustela>
  62. REGULAMENTO (UE) 2016/679 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 27 de abril de 2016 relativo à proteção das pessoas singulares no que diz respeito ao tratamento de dados pessoais e à livre circulação desses dados e que revoga a Diretiva 95/46/CE (Regulamento Geral sobre a Proteção de Dados) [Acedido a 19 de junho de 2018] Disponível na Internet: [https://protecao-dados.pt/wp-content/uploads/2017/07/Regulamento\\_Geral-Prote%C3%A7%C3%A3o-Dados.pdf](https://protecao-dados.pt/wp-content/uploads/2017/07/Regulamento_Geral-Prote%C3%A7%C3%A3o-Dados.pdf)
  63. REGULAMENTO (UE) N. o 655/2013 DA COMISSÃO de 10 de julho de 2013 que estabelece critérios comuns para justificação das alegações relativas a produtos cosméticos. [Acedido a 29 de maio de 2018] Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2013:L090:0031:0034:PT:PDF>