



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Descoberta e desenvolvimento de inibidores da 17β-HSD-1 potencialmente úteis no tratamento do cancro da mama

**Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia
Comunitária e Investigação**

Aura Maria de Morais Vaz

Relatório de Estágio para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas
Ciclo de Estudos Integrado

Orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre
Co-orientador: Prof^a. Doutora Luiza Granadeiro

Covilhã, Junho de 2012

Ao Bruno Abreu, porque o amor permanece ainda que separado por vales de ignomínia distância escoltada pela Saudade. Que elas se desvançam nesta nova fase da vida, e que no futuro impere enfim a partilha de uma vida preenchida de júbilo.

Aos meus pais, avós e irmã Marta, que o amor de família seja sempre a força motriz da felicidade.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, expresso um agradecimento profundo ao meu orientador, Professor Dr. Samuel Silvestre, por me ter introduzido ao mundo da química orgânica e farmacêutica e orientado com toda amizade, dedicação e continuidade, por todo o trabalho, confiança e paciência investidas em mim durante o trabalho para a obtenção do meu grau de mestre em Ciências Farmacêuticas. Agradeço também todo o apoio e amizade à minha co-orientadora Prof^a. Dra. Luiza Granadeiro e também agradeço à Prof^a. Dra. Carla Cruz pelo auxílio nas experiências de RMN.

Aos meus amigos e colegas de estudo e de trabalho no laboratório, com quem partilhei bons momentos de alegria e que nunca me abandonaram, sendo sempre um apoio nos momentos de maior trabalho e indecisão, muito agradeço! As saudades vão permanecer e ficarão sempre na minha memória com amizade! Ágradeço também especialmente à Tânia, Rita e Mafalda, por toda a amizade, paciência e apoio que partilhámos umas com as outras nesta difícil fase de escrita do Relatório de estágio!

Foi com muito apreço que no fim do meu percurso académico tive a oportunidade de contactar com o ambiente e vida diária da farmácia comunitária. Presto um marcado agradecimento a toda a equipa da Farmácia Sant'Ana, com quem criei bons laços de amizade, e um agradecimento muito especial à diretora técnica, Dr^a. Paula Bártole por todo o apoio e elevada contribuição pessoal e científica que me proporcionou. Todos me acolheram com a maior atenção e simpatia, e me orientaram durante as horas de estágio, onde sempre me senti em casa.

Um especial e profundo agradecimento à minha família: pais, irmã, avós, tios e primos, e ao meu namorado Bruno, por todo o apoio e amor que me deram ao longo de todo o meu percurso académico e vida.

Finalmente, e não querendo esquecer ninguém, agradeço a todos os que, de uma forma ou outra, me ajudaram neste caminho!

Prefácio

Este Relatório de Estágio visa englobar e dar a conhecer ao público académico as áreas exploradas no estágio curricular de final de curso, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sendo elas as áreas de Investigação (cuja escolha pessoal foi a vertente de Química Farmacêutica) e de Farmácia Comunitária, que no total perfizeram 800h de constante aprendizagem e enriquecimento pessoal e científico.

A perspetiva futura de um farmacêutico avizinha-se crítica, mas a força de espírito jamais poderá esmorecer em nós, futuros profissionais de saúde, com sonhos e ideais para além do impossível. Sonhemos sempre, lutemos sempre - juntos construiremos e receberemos um futuro melhor, um futuro digno e merecedor para todos nós.

Resumo

Capítulo I

O cancro da mama é o cancro mais comum entre as mulheres. Neste contexto, diversos estudos evidenciam que entre 40 a 60% de todos os cancros da mama são considerados hormono-dependentes, dependendo principalmente de 17 β -estradiol para o seu desenvolvimento. No corpo humano, este estrogénio é originado maioritariamente a partir da estrona, um estrogénio com baixa atividade estrogénica, pela ação da enzima 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 (17 β -HSD-1). Como esta enzima se encontra em elevadas quantidades em tecidos cancerígenos dependentes de estrogénios e tem elevada seletividade, a descoberta de inibidores da 17 β -HSD-1, com o objetivo de minimizar a formação de estradiol, está a ganhar grande interesse nos dias de hoje.

Assim, baseado no conhecimento prévio de que vários D-homoesteroides têm interessantes propriedades inibitórias da 17 β -HSD-1, neste trabalho pretende-se desenvolver vários derivados da estrona como potenciais inibidores da 17 β -HSD-1 com elevadas propriedades inibitórias, baixa toxicidade e preparação sintética simples. Para este propósito foram realizados estudos computacionais, tais como o *docking* molecular e avaliação toxicológica *in silico*. A partir destes estudos, várias moléculas, em especial derivados da estrona funcionalizados em C2 e C3 e os seus homólogos com anel de D de 6 membros, lactonizado, foram seleccionados como potenciais novos inibidores da 17 β -HSD-1.

Os resultados de *docking* realizados com o programa *AutoDock Vina*, revelaram que os referidos derivados lactonizados da estrona possuem elevados valores de afinidade para a enzima, quando comparados com os seus homólogos com anel D de 5 membros, e quando comparados com outros homólogos D-Homo, revelaram possuir iguais ou mesmo até superiores afinidades. Todos os compostos funcionalizados em C2 apresentaram valores de afinidade superiores quando comparados com o valor de afinidade da estrona, em especial substituintes hidrofóbicos ou com elevadas propriedades eletronegativas. Este tipo de funcionalização é vantajoso, já que se encontra descrito que diminui a estrogénica dos compostos. Adicionalmente descobriu-se também que substituições em C3, com grupos aceitadores em pontes de hidrogénio, como grupos éster ou heterocíclicos, bem como grupos lipofílicos, dão origem a compostos com elevados valores de afinidades. Os estudos de toxicidade *in silico* revelaram que as moléculas avaliadas são seguras em termos de efeitos mutagénicos, tumorigénicos, irritantes ou em efeitos a nível reprodutivo, exceto para as moléculas substituídas com C6-OH, que apresentaram risco a nível reprodutivo.

Neste momento estão ainda a ser realizadas sínteses químicas e a iniciar-se a avaliação biológica *in vitro*, com o objetivo de confrontar com os resultados obtidos nos cálculos computacionais e de efetuar estudos de relação-estrutura-atividade (REA) para este tipo de novos compostos inibidores da 17 β -HSD-1.

Capítulo II

O capítulo II pretende resumir a minha participação no estágio profissional realizado na área da farmácia comunitária na Farmácia Sant'Ana - Covilhã. Nele encontram-se descritas todas as áreas de trabalho e funcionalidades, as funções desempenhadas pelo farmacêutico, entre outros diversos aspetos fundamentais para o funcionamento desta unidade de saúde dirigida para a comunidade.

Palavras-chave

Inibidores da 17 β -HSD-1, cancro da mama, descoberta de fármacos, *docking* molecular, toxicidade *in silico*, farmácia comunitária

Abstract

1st Chapter

Breast cancer is the most common cancer in women. In this context, several studies evidenced that 40 to 60% of all breast cancers are considered hormone-dependent, relying especially on estradiol for their development. In the human body, this estrogen is originated from estrone, an estrogen with low estrogenic activity, by the action of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD-1). As this enzyme is encountered in high amounts on estrogen-dependent cancer tissues and has high selectivity, the discovery of 17 β -HSD-1 inhibitors, in order to minimize the formation of estradiol, is gaining high interest nowadays. Thus, based on previous knowledge that several D-homosteroids have interesting 17 β -HSD-1 inhibitory properties, our group has been developing several new estrane derivatives as potential 17 β -HSD-1 inhibitors with higher inhibitory properties, low toxicity and simpler synthetic preparation. For this purpose, computational studies, like molecular docking and *in silico* toxicological evaluation have been performing. From these studies, several molecules, mainly C2 and C3 functionalized estrone derivatives and their homologues with the lactonized D-ring have been elected as potentially novel 17 β -HSD-1 inhibitors. Interestingly, docking results performed with AutoDock Vina revealed that the lactonized estrone derivatives have higher affinity values to the enzyme when compared to all their 5-membered D-ring homologues as well as equal or higher affinity values compared to the previously reported D-Homo derivatives. *In silico* toxicity tests also revealed that all molecules were safe regarding on mutagenic, tumorigenic, irritant or reproductive effects, except for C6-OH substituted molecules that presented risk on reproductive level. At the moment, chemical synthesis and *in vitro* biological evaluation are being performed.

2nd Chapter

This chapter aims to resume the professional traineeship realized in the field of Community Pharmacy, it's presented in Chapter 2 an overview of the working areas and fields of this health unit managed for the society.

Keywords

17 β -HSD type 1 inhibitors, breast cancer, drug discovery, molecular docking, *in silico* toxicity, Community Pharmacy.

Índice

Capítulo I - Estágio em Investigação

Descoberta e desenvolvimento de potenciais inibidores da 17 β -HSD-1 potencialmente úteis no tratamento do cancro da mama

1.1 Introduction	1
1.1.1 Breast Cancer and 17 β -HSD-1	1
1.1.1.1 Current breast cancer therapeutic approaches	3
1.1.2 17 β -HSD-1	4
1.1.2.1 Function and structure	4
1.1.2.2 Mechanism of action	5
1.1.2.3 Steroidal inhibitors of 17 β -HSD-1	6
1.1.3 Drug design and discovery - the importance of computational methods: molecular docking and <i>in silico</i> toxicity studies	13
1.1.3.1 (Q)SARs and <i>in silico</i> studies	13
1.1.3.2 Molecular Docking	14
1.1.3.2.1 Docking software	15
1.2 Objectives	17
1.3 Materials and methods	18
1.3.1 Computational studies	18
1.3.1.1 Software	18
1.3.1.2 Preparation of the ligands for molecular docking: 3D molecular structures, minimizing energy and file formats	18
1.3.1.3 Choosing and preparing the macromolecule for docking experiments	19
1.3.1.4 Grid-Box	19
1.3.1.5 Testing the accuracy of docking experiments	20
1.3.1.6 Docking results	21
1.3.1.7 <i>In silico</i> toxicity studies	22
1.3.2 Materials used on chemical synthesis	22
1.3.2.1 Reagents and solvents	22
1.3.2.2 Chromatography	22
1.3.2.3 Equipment and other devices	22
1.3.3 Experimental process	23
1.3.3.1 Baeyer-Villiger reaction of Estrone	23
1.3.3.2 Iodination reaction of Estrone with Sodium Iodide and Sodium Chlorite	23
1.3.3.3 Iodination reaction of Estrone with Iodine and Copper (II) chorite di-hydrated (CuCl ₂ .H ₂ O)	24
1.3.3.4 Nitration reaction of Estrone with Nitric Acid	25

1.3.3.5 Bayer-Villiger reaction of 2-nitroestrone	26
1.4 Results and Discussion	28
1.4.1 Computational studies	28
1.4.1.1 Molecular Docking studies	28
1.4.1.2 <i>In silico</i> toxicity studies	39
1.4.2 Chemical synthesis	39
1.5 Conclusions	43
1.6 Bibliography	44

Capítulo II - Estágio em Farmácia Comunitária

2.1 Introdução	51
2.2 Organização da farmácia Sant'Ana	52
2.2.1 Localização	52
2.2.2 Recursos humanos	52
2.2.3 Funções do Diretor Técnico, seus substitutos e adjuntos	53
2.2.4 Espaço físico da farmácia	54
2.2.5 Elementos interiores e exteriores distintivos da farmácia	55
2.2.6 Equipamentos gerais e específicos da Farmácia	55
2.2.7 Sistema informático	56
2.2.8 Gestão de qualidade	56
2.3 Informação e documentação científica	57
2.4 Medicamentos e outros produtos de saúde	58
2.4.1 Definições	58
2.4.2 Gamas de produtos de saúde disponíveis na farmácia	59
2.5 Aprovisionamento e Armazenamento	60
2.5.1 Aprovisionamento	60
2.5.1.1 Gestão de encomendas	60
2.5.1.2 Seleção dos fornecedores	60
2.5.1.3 Receção das encomendas	61
2.5.1.4 Preços	61
2.5.1.5 Prazo de Validade	62
2.5.1.6 Devoluções	62
2.5.1.7 Psicotrópicos, Estupefacientes e Benzodiazepinas	63
2.5.2 Armazenamento	64
2.5.2.1 Disposição dos medicamentos	64
2.5.2.2 Controlo de Temperatura e Humidade	65
2.6 Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento	66
2.6.1 Comunicação Utente-Farmacêutico	66

2.6.2	Uso racional de Medicamentos	66
2.6.3	Armazenamento domiciliário de medicamentos	67
2.6.4	Farmacovigilância	67
2.6.5	VALORMED	68
2.7	Dispensa de medicamentos	69
2.7.1	Medicamentos de uso humano	69
2.7.2	Receitas médicas	69
2.7.2.1	Elementos presentes na receita médica	69
2.7.2.2	Interpretação da receita médica	70
2.7.2.3	Quando se poderá dispensar um medicamento genérico na receita médica?	71
2.7.2.4	Organização das receitas	72
2.7.3	Vendas suspensas e a crédito	72
2.7.4	Receitas médicas especiais - Estupefacientes e Psicotrópicos	72
2.7.5	Comparticipação de Medicamentos	73
2.7.5.1	Regimes de participação	73
2.7.5.2	Medicamentos Genéricos e Preços de referência	74
2.8	Automedicação	75
2.9	Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde	77
2.9.1	Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene	77
2.9.2	Produtos dietéticos para alimentação especial	77
2.9.3	Produtos dietéticos infantis	78
2.9.4	Fitoterapia e suplementos nutricionais (nutracêuticos)	79
2.9.5	Medicamentos de uso veterinário	80
2.9.6	Dispositivos médicos	80
2.10	Outros cuidados de saúde prestados na farmácia	82
2.10.1	Medição de Glicémia	82
2.10.2	Medição dos Triglicéridos e Colesterol	82
2.10.3	Medição da tensão arterial	83
2.10.4	Antropometria	83
2.10.5	Consultas de nutrição	83
2.10.6	Administração de vacinas	83
2.11	Preparação de medicamentos	85
2.11.1	Matérias-primas	85
2.11.2	Material de laboratório	86
2.11.3	Preparações magistrais e officinais e Controlo de qualidade	87
2.11.4	Preço dos medicamentos preparados	88
2.11.5	Rotulagem e Validade	89
2.11.6	Várias preparações	89
2.11.6.1	Preparações extemporâneas de especialidades	89

farmacêuticas	
2.11.6.2 Preparação do xarope de Propanolol	90
2.12 Contabilidade e Gestão da farmácia	91
2.12.1 Colaboradores da Farmácia	91
2.12.2 Faturação e receituário	91
2.12.3 Documentos contabilísticos	92
2.12.4 Obrigações fiscais, preços e princípios gerais que os regem	94
2.13 Conclusão	95
2.14 Bibliografia	96
ANEXO I	97
ANEXO II	98
ANEXO III	100
ANEXO IV	104
ANEXO V	107

Lista de Figuras

Capítulo I

Figure 1.1	The evolution of a breast cell from normal to the neoplastic phase.	1
Figure 1.2	Partial representation of steroidogenesis, and substrates transformed by 17 β -HSD type 1.	3
Figure 1.3	17 β -HSD type 1 complexing with 3 β -diol (cyan).	5
Figure 1.4	Proposed mechanism of action of 17 β -HSD type 1 in complex with Estrone.	6
Figure 1.5	Examples of C3 substituted estrogens.	7
Figure 1.6	Examples of C6-substituted estrogens.	8
Figure 1.7	Example of C9-substituted estrogen.	8
Figure 1.8	Examples of C15-substituted estrogens.	9
Figure 1.9	Examples of C16-substituted estrogens. The compounds are examples of hybrid inhibitors.	10
Figure 1.10	Examples of C17-substituted estrogens.	10
Figure 1.11	General structure of D-homo estrogens with substitutions on C2 and C16.	11
Figure 1.12	Example of an estrogen with an heterocyclic E-ring, linked to a pyridyl moiety.	11
Figure 1.13	Tibolone structure.	11
Figure 1.14	Comparison of D-homo estrone with the D-lactonized estrone (called estrololactone) respectively.	12
Figure 1.15	Workflow for the use of drug and chemical toxicity databases and models; starting from the source of data to the goal of predicting human health effects.	14
Figure 1.16	Grid Box for 3KMO.pdb.	20
Figure 1.17	Superimpose of the docked ligand (cyan) and the crystalized ligand	21

(green) in the binding pocket in affinity mode 4.

Figure 1.18 Schematic representation of Baeyer-Villiger reaction of estrone	23
Figure 1.19 Schematic representation of iodination reaction	23
Figure 1.20 Schematic representation of iodination reaction to afford both 2 and 4-iodoestrone	24
Figure 1.21 Schematic representation of nitration reaction	25
Figure 1.22 Scheme of Baeyer-Villiger reaction for 2-nitroestrone	26
Figure 1.23 Docked result for 17 .	29
Figure 1.24 Docked C2-substituted compounds 7 , 26 and 21 in the crystal PDB# 3KM0 by AutoDock Vina.	30
Figure 1.25 Superimposal of docked results for C6 β 27 (purple) and C6 α 28 (golden).	31
Figure 1.26 Docked results for compounds 9 (magenta), 19 (yellow) and 44 (cyan). Notice the different types of interactions related to the importance of ring torsion.	32
Figure 1.27 Examples of moieties substituted on C3 proposed by our group.	33
Figure 1.28 Docking of the suggested compounds 58 and 60 .	33
Figure 1.29 Resume of interactions of estrogen substitutions with 17 β -HSD binding pocket.	34
Figure 1.30 Synthetic pathway proposed to our work. The starting material is Estrone.	40

Lista de Tabelas

Capítulo I

Table 1.1	General SAR for estrogen derivatives inhibitors of 17 β -HSD type 1.	12
Table 1.2	Grid Parameters	20
Table 1.3	Results obtained for estrone derivatives	35
Table 1.4	Results obtained for estrone derivatives	36
Table 1.5	Results obtained for estrone D-lactonized ring derivatives	36
Table 1.6	Results obtained for estrone D-lactonized ring derivatives	37
Table 1.7	Results obtained for compounds 6 and 16	37
Table 1.8	Results obtained for docking of some D-homo derivatives	38
Table 1.9	Results obtained for estrone derivatives C3-substituted	38
Table 1.10	In silico toxicity results. N (drug conform) Y (undesired effect - intermediate state)	39

Capítulo II

Tabela 2.1	Valores de pressão sistólica e diastólica com respectiva classificação	83
-------------------	--	----

Lista de Acrónimos

Capítulo I

17 β -HSD-1	17 β - Hydroxysteroid Dehydrogenase type 1
3 α -HSD	3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase
3D	Three-dimensional
ADMET	Absorption, distribution, metabolism and excretion-toxicity
AKR	Aldo-keto-reductase
AOM	5- α -androstan-3 β
cLogP	Calculated LogP
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DNA	Deoxyribonucleic acid
EA	Ethyl acetate
eq	Equivalents
ER	Estrogen Receptor
HTS	High-Throughput Screening
ILS	Iterated Local Search
MCPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid or 3-chloroperoxybenzoic acid
MM2	Molecular Mechanics
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OOP	Out of plane
PDB	Protein Data Bank
PE	Petroleum Ether
Ph	Phenyl
QSAR	Quantitative structure-activity relationship
RMS	Root mean square
SAR	Structure-activity relationship
SDR	Short-chain dehydrogenase reductase
THF	Tetrahydrofurane
TLC	Thin-layer chromatography
VS	Virtual Screening

Capítulo II

ADME	Assistência na Doença aos Militares do Exercito
ANF	Associação Nacional de Farmácias
ARS	Administração Regional de Saúde

CEDIME	Centro de Informação sobre Medicamentos
DCI	Denominação Comum Internacional
DGF	Direção Geral de Farmácia
FP	Farmacopeia Portuguesa
IRC	Imposto de Rendimento de pessoas Coletivas
IRS	Imposto de Rendimento de pessoas Singulares
IVA	Imposto sobre o Valor Acrescentado
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MSRM	Medicamento Sujeito a Receita Médica
OTC	<i>Over-The-Counter</i>
PIC	Preço impresso na embalagem
PMA	Preço Máximo Autorizado
PVF	Preço de Venda à Farmácia
PVP	Preço de Venda ao Público
SBC	Sindicato de Bancários do Centro
SNS	Sistema Nacional de Saúde

Chapter I - Discovery and development of 17 β -HSD-1 inhibitors potentially useful in breast cancer treatment

1.1 Introduction

1.1.1 Breast cancer and 17 β -HSD-1

Breast cancer is one of the most common cancer diagnosed among women, and the third cause of death among them.^{1,2,3} In Portugal, each year are detected about 4500 new cases of breast cancer, about 1500 women dying because of it.¹ A high percentage of this cancer is hormone dependent - around 40 to 60% of all breast cancers and 75% of postmenopausal cases are hormone dependent, and have Estrogen Receptor (ER)-positive status, relying especially on estrogens for its growth, development and proliferation. For this reason, a good treatment approach may possibly depend on lowering estrogen levels in cancer tissues rather than in the hole organism. Breast cells suffer evolutions from the beginning of the formation of the tumor involving, for example, its ER status (**Figure 1.1**)^{3,4}. In fact, a cancer that is hormone-dependent has a good prognosis concerning disease evolution and treatment, than one that is hormone-independent and has ER-mutated or non-functional. These non-functional receptors can explain why some women who are diagnosed having ER-positive tumors fail to respond to anti-estrogen therapy³.

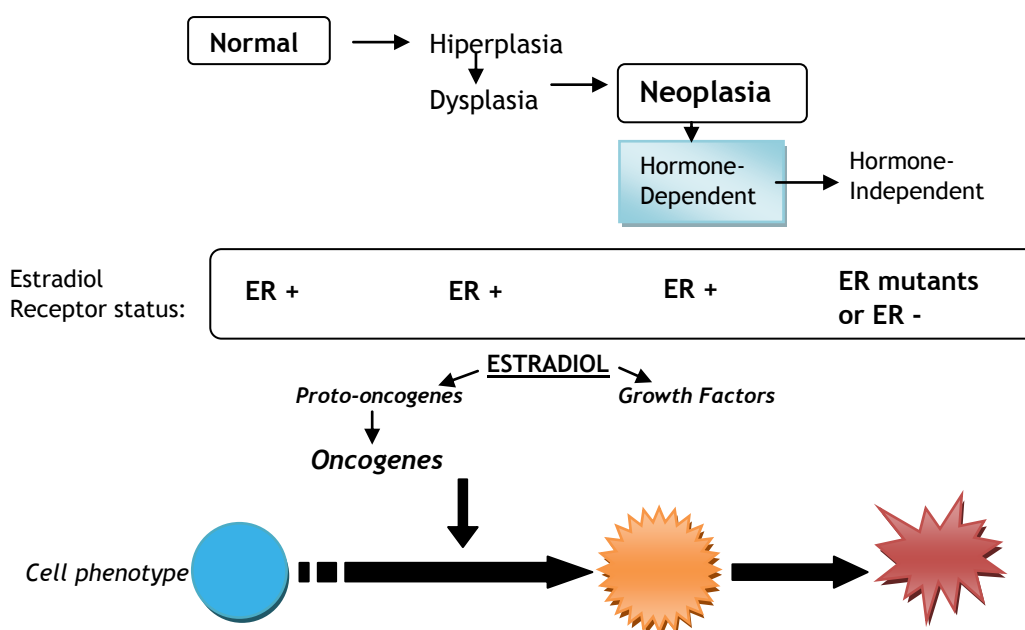


Figure 1.1 - The evolution of a breast cell from normal to the neoplastic phase. Adapted from Jorge R. Pasqualini *et. al.*³

Estradiol is a natural hormone present in the human body that presents the highest estrogenic activity - it is a ligand of the ER, and plays a critical role in the development of estrogen-dependent pathologies, including, besides breast cancer, a condition called endometriosis^{5,6}. Meanwhile, estrone is an estrogen with less estrogenic activity, not directly related to the pathologies mentioned before⁵. The binding of estradiol to the estrogen receptor triggers the formation of a complex that will interact with DNA, promoting the induction of biological responses at a cellular level, including cellular proliferation or protein synthesis (**Figure 1.1**).

In breast carcinoma tissues, local estrogens are originated through two main pathways: one involves aromatase that functions as an androgen-estrogen converter and other uses steroid sulfatase, which converts estrone-3-sulphate (without estrogenic activity) to estrone^{5,7,8}. In this context, 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 (17 β -HSD-1) is an enzyme involved in the last step in the synthesis of estrogens, being responsible for the final conversion of estrone, originated mainly by estrone sulfatase and also by aromatase, into estradiol (**Figure 1.2**)^{8,9}. This enzyme is also responsible for other reductive conversions, like the transformation of androstenedione into testosterone and of DHEA into 5-diol, corresponding only to less than 10% of its total activity¹⁰. This enzyme is not only overexpressed in breast cancer tissues, presenting high activity, but also has been found abundantly expressed in the granulosa cells of ovary, syncytiotrophoblasts of the placenta, liver and endometrium tissues, as well as in their tumors and in prostate tumors^{5,11,12,13,14,15}. In addition, it is also found in skin and fat tissue. It should be noted that estrogens, especially estradiol, in these tissues, have activities in the same cells where they are formed, acting in an intracrine way^{5,3}. In almost 50% of breast cancer tissues and endometrial cancer cell lines, overexpression of 17 β -HSD-1 mRNA has been reported, and also has been characterized as a prognostic marker for disease progression^{5,8}.

Thus, suppressing the activity of this enzyme would result on reduced levels of estradiol formed, promoting a tumor regression, and, if we can talk about a forthcoming claim, the cure of this cancers^{16,25}. Therefore, the inhibition of this selective enzyme, 17 β -HSD-1, is an attractive approach for the design of new anti-tumor drugs, included in the so called steroidogenesis controllers.^{8,17} In fact, inhibition won't probably affect the biosynthesis of other important steroid hormones, and thus the incidence of adverse effects, so common in chemotherapy, will be reduced. Also, the fact of this enzyme is overexpressed in this kind of tumors is interesting, because inhibition would cause a diminution of the estrogens more specifically in those places, instead of in the whole body⁶. For these reasons, it is not surprising that this target is being highly studied by several research groups nowadays, and consequently a considerable amount of new promising compounds that can inhibit it have been found recently. Nevertheless, none of these compounds have been progressed to clinical trials^{11,18}. It is crucial that inhibitors need to be designed carefully: since 17 β -HSD-1 and 2 may have opposing action (type 2 converts estradiol into estrone), the former inhibitors must be screened for selectivity toward the later^{14,19}.

Considering the importance of this enzyme it is important to know its structure, characteristics and inhibitors developed until now, as we are going to see further on this introduction.

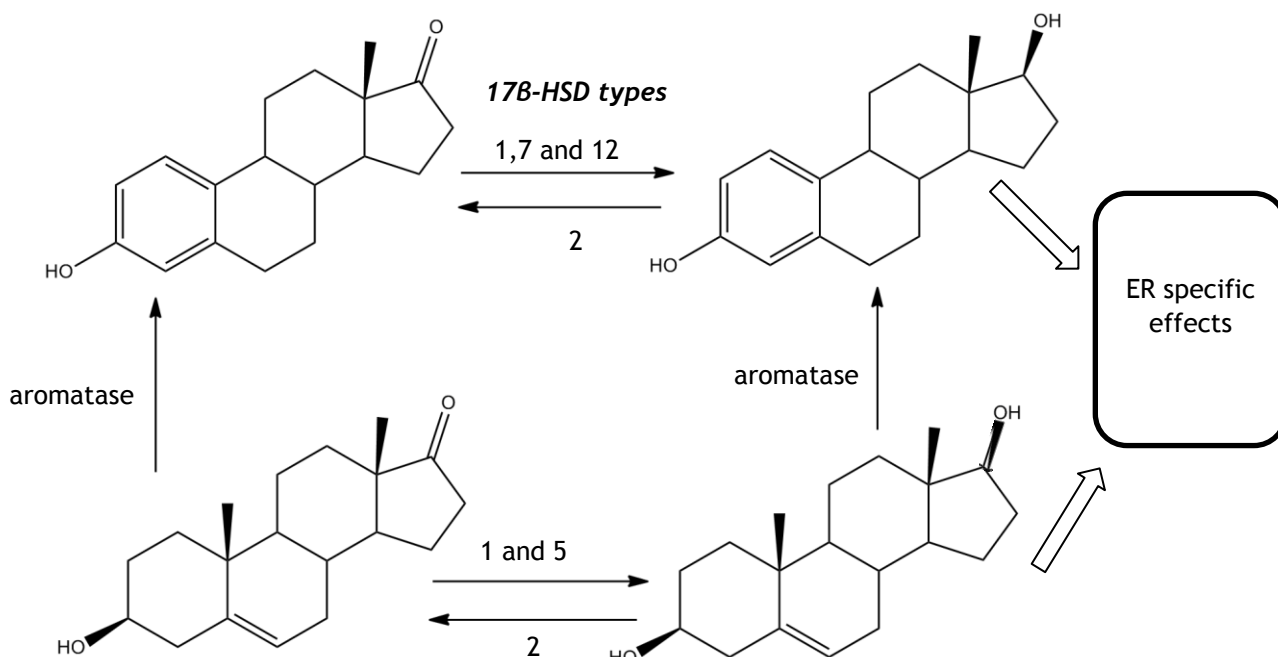


Figure 1.2 - Partial representation of steroidogenesis, and substrates transformed by 17 β -HSD type 1. Adapted from D. Poirier.¹⁷

1.1.1.1 Current breast cancer therapeutic approaches

There are several available treatment approaches for breast cancer, and those include: surgery (including lumpectomy, partial mastectomy and total mastectomy, and recently, conservative surgery¹), sentinel lymph node biopsy followed by surgery, radiation therapy, chemotherapy, hormone therapy and targeted therapy²⁰. Surgery has a great impact in women life, especially concerning total mastectomy, causing nefarious moral consequences, hard post-surgical pain or loss of mobility of the upper members. Nowadays, surgery generally avoids total mastectomy, using instead less invasive procedures, as partial mastectomy and conservative surgery and is combined with radiotherapy and chemotherapy or/plus hormonal substitution, which has augmented the rate of survival on the women with this cancer. Chemotherapy consists in applying drugs that suppress or blocks cell proliferation, reducing tumor recurrence. The drugs available and approved for breast cancer treatment, as described by National Cancer Institute of USA²⁰, include:

- Alkylating agents: Cyclophosphamide;
- Antimetabolites: Methotrexate, fluorouracil and capecitabine (that is metabolized to fluorouracil) and gemcitabine;

- Topoisomerase II inhibitors: Antraciclins (doxorubicin, epirubicin)
- DNA intercalating cytotoxics: doxorubicin;
- Citotoxics that interfere with tubuline: taxanes (paclitaxel, docetaxel);
- Tiroquinases inhibitors;
- Others: estrogen receptors antagonists (Fulvestrant and toremifene), aromatase inhibitors (anastrozole, exemestane and letrozole), Ixabepilone and Lapatinib Ditosylate^{2, 20}.

Given the high percentage of hormone dependent breast tumors, composed by hormone-sensitive/dependent cells, hormone therapy is one of the most important approaches on breast cancer. This therapy consists in avoiding that cancer cells have access to estrogens needed for their development which can greatly help to stop or prevent the growth of the tumor¹. ER-positive breast cancers are usually treated with anti-estrogens, like tamoxifen. They bind ER instead of estrogen hormones blocking its effects. The main problem of tamoxifen is that it is not a pure anti-estrogen: depending on the location of ER, it presents estrogenic or anti-estrogenic activity. Therefore, while in breast tissue it presents anti-estrogenic activity, in endometrium it presents estrogenic activity, and then, although long-term adjuvant tamoxifen is beneficial, it can cause endometrium carcinoma^{7,20,21}. For this reason nowadays researchers try to find pure anti-estrogens, or other selective drugs²⁵. These substances have, as the ones included on chemotherapy, systemic activity, affecting all cells of the organism¹.

We focus our attention on 17 β -HSD-1 as being part of a development of a novel kind of treatment, called steroidogenesis control, consisting on the control of the production of endogen estrogenic compounds, such as estradiol. 17 β -HSD-1 is not the only target, as we can find other enzymes involved on steroidogenesis, like other types of 17 β -HSDs, 3 α -HSD, 5 α -reductase, aromatase and estrone sulfatase^{8,22,23}. Aromatase inhibitors are clinically available for treatment, and can be used by some postmenopausal women that have hormone-dependent breast cancer²⁰. As for aromatase and 17 β -HSD-1, estrone sulfatase is responsible for maintaining high levels of estradiol in tumor cells - this enzyme catalyzes the hydrolysis of estrone sulfate to estrone, which is subsequently reduced to estradiol by 17 β -HSD-1. The plasmatic concentration of estrone sulfate is greatly higher in women with breast cancer⁸.

1.1.2 17 β -HSD-1

1.1.2.1 Function and structure

The human 17 β -HSD-1 is a cytoplasmic reductive enzyme of the short-chain dehydrogenase/ (SDR) reductase and aldo-keto-reductase (AKR) (the only one being 17 β -HSD-5) super-families (**Figure 1.3**). This enzyme catalyzes the stereo-specific oxido-reduction reactions of alcohols to carbonyls and, to date, 14 human 17 β -HSDs have been identified^{5,24,26}. It is an homodimer, each subunit consisting of 327 amino acids, with a molecular weight between 34.5 and 34.9kDa, and it is dependent on NADH or NADPH as a cofactor^{7,24,26,27}. As seen before, it is a

reductive enzyme, 90% of its activity being responsible for the conversion of estrone into 17 β -estradiol.



Figure 1.3 - 17 β -HSD type 1 complexing with 3 β -diol (cyan). Notice the cofactor NADPH (magenta) near the molecule and the presence of water molecules (red dots) on the binding pocket. This image was created with PyMol, from the crystal PDB# 3KM0, used in our work to perform the docking studies.

For some authors, the binding pocket of this enzyme might be a catalytic tetrad of Asn114, Ser142, Tyr155 and Lys159^{26,28}. Others consider that the tetrad sequence is composed by Tyr-X-X-X-Lys and a Ser residue, common to the dehydrogenases^{15,25,27}. For another's it can be divided into three regions: the first recognizes the steroid phenolic A-ring and contains His221 and Glu282, which could form hydrogen bonds with O3 of the steroid: the second region binds to the central hydrophobic core of the steroid and contributes to the main thermodynamic force favoring the binding of substrates, and the third region is the catalytic region, that surrounds the D-ring and catalyzes the reduction of the carbonyl moiety to the hydroxyl present on estradiol, and contains Ser142, Tyr155 and Lys159⁵.

1.1.2.2 Mechanism of action

The proposed mechanism of action is described in **Figure 1.4**. As can be seen, an hydrogen from NADPH attacks the C17 of estrone, forming an alcoholate stabilized by Tyr155 and Ser142. Then, Tyr155 transfers an hydrogen to estrone, being further reestablished by Lys159, which, in turn, is re-protonated by a water molecule^{5,29,30}. Lys159 is also responsible for the stabilization of the dinucleotide NADP⁺, by interacting with its ribose⁷.

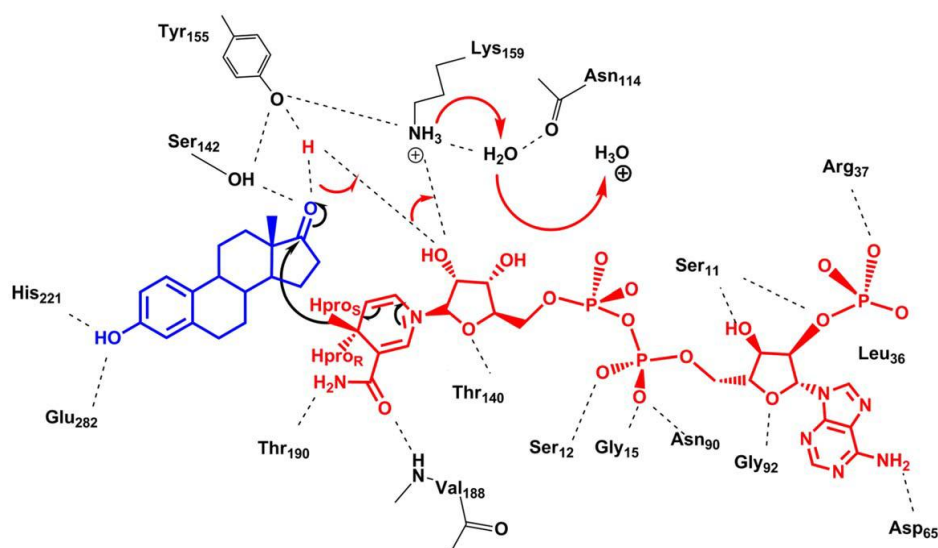


Figure 1.4 - Proposed mechanism of action of 17β-HSD type 1 in complex with estrone. Adapted from M. Neggry and Hartmann *et. al.* ²⁹. The substrate E1 is represented in blue, the cofactor NADPH in red. The amino acids, which are either involved in the catalysis or are responsible for ligand/cofactor stabilization, are colored in black. The hydrogen bonds are in dashed lines while the proton transfers are highlighted with arrows.

1.1.2.3 Steroidal inhibitors of 17β-HSD-1

The knowledge of crystal structure of this enzyme greatly enhanced the design of several molecules that are promising 17β-HSD-1 inhibitors¹⁸. There are several structural classes of 17β-HSD-1 inhibitors and, as a major approach, we can divide the inhibitors of this enzyme as steroidal and non-steroidal^{17,26,31}. These molecules can also be grouped by their mechanism of action in three classes: the ones that compete with NADPH for its binding site, the ones that compete with the natural substrate, being mostly steroidal compounds, triggering reversible (the majority of the compounds seen below) or irreversible inhibition (mainly caused by substitutions on C16), and a third class of inhibitors, consisted of the so-called hybrid compounds, combining moieties from NADPH and estradiol/estrone (this is, parts of both cofactor and substrate)²⁶.

To test their inhibition capacity, compounds are assayed by different methods or strategies, presenting different values of IC_{50} or percentages of inhibition, depending on the method chosen. Therefore, it isn't appropriated to directly compare the values obtained for the various compounds tested by different strategies, but one can have an idea of the capacity of inhibition provided by them. For this reason, a positive control must be included as a reference in all assays. The methods usually used to test the capacity of inhibition by the chemicals consist in:

- Testing the compounds in homogenated HEK-293 transfected cells overexpressing 17β-HSD-1, in T-47D cells or transfected MCF-7 cells, by calculating of the amount of estrone transformed into estradiol;

- Testing the compounds using the cytosolic fraction of human placenta (rich in 17 β -HSD-1) by calculating the amount of estrone transformed into estradiol;
- Directly measuring the transformation of estradiol into estrone in pure 17 β -HSD-1¹⁷.

The estrogenicity of the compounds, can be evaluated by the study of proliferative activity on estrogen-sensitive cells, like T-47D, ZR-75-1 or MCF-7 cells¹⁷. It is of remarkable importance to develop compounds with low estrogenic activity, in order to avoid cancer cell proliferation²⁵.

Non-steroidal 17 β -HSD-1 inhibitors that are being under study include phytoestrogens, which are most potent inhibitors among the naturally substances, but unfortunately are non-specific, gossypol and related compounds, thiophenopyrimidinone derivatives, 1-substituted 6-phenylnaphthalene derivatives, glycyrrhetic acid derivatives, phenyl ketones, imidazoles and cinnamic acid ester derivatives, biphenyl mimics of estrone, thiophenopyrimidinones, (hydroxyphenyl) naphthols, bis(hydroxyphenyl) substituted arenes, flavonoids with OH in A-ring and heterocyclic substituted biphenylols^{14,17,18,25,26}. These compounds share common structural features, such as a phenolic ring and hydrophobic scaffolds, which will interact with the amino-acids present on the binding pocket of 17 β -HSD-1¹¹. The major disadvantage of some natural phytoestrogen compounds, including flavonoids, is that they generally present unfavorable pharmacokinetic/ ADMET (absorption, distribution, metabolism, and excretion) characteristics and low-specificity due to cross-reactivity with other steroid metabolizing enzymes and steroid hormone receptors^{19,25}.

In the group of steroidal inhibitors, we can make the following division - estrogen derivatives and non-estrogen steroids. Estrone and estradiol derivatives are largely described as 17 β -HSD-1 inhibitors, although estrone derivatives present more inhibitory capacity than the estradiol ones, due to the carbonyl at C17²⁶. Next, general aspects of SAR (Structure Activity Relationship) are presented. Starting by the A ring, we can find:

- The C2 substituted estrogens (this substitution is believed to reduce estrogenic activity²⁶, and also add some inhibition activity, especially with hydrophobic substitutions); generally includes small groups (see below)^{17,26}.
- C3 substituted estrogens; also combined with substitutions on C2 and C15 and others, the moieties found are generally CH₃, CH₂Ph, SO₂NH₂ and SO₃OH, the sulfamates being weak inhibitors²⁶; generally, in all inhibitors, the moiety present in C3 is the hydroxyl (OH).

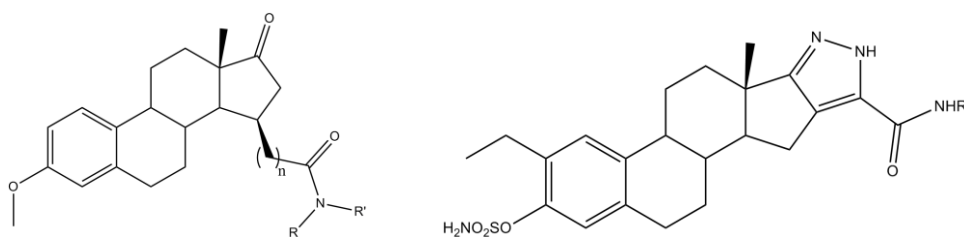


Figure 1.5 Examples of C3-substituted estrogens

In the B ring, we can find the following substitutions:

- C6 substituted: some oxime derivatives and carbonyl moiety; they present some estrogenic activity, that is undesired for the treatment of this kind of cancers; the 6-substitution accompanies 16 and 17 substitutions, or can be alone; it was shown that the β configuration is preferable than the α to achieve better inhibition values ^{17,26}.

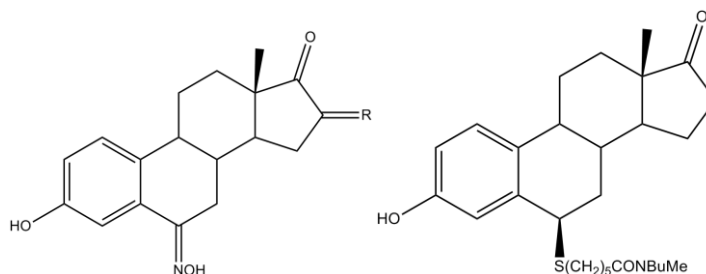


Figure 1.6 - Examples of C6-substituted estrogens

In the C ring, the substitutions are unusual; however, we can find the follow:

- C9 substitutions, described in the α plane, as a methyl group, along with some substitutions in C15, 16, 17 and others ¹⁷.

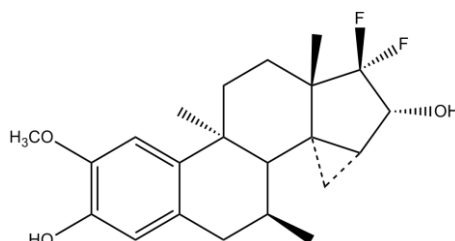


Figure 1.7 - Example of C9-substituted estrogen

D-ring is the most functionalized ring, presenting a variety of substitutions, combined or not with substitutions on the other steroid rings. In this group, another kind of new inhibitors is included: the estradiol hybrid derivatives, linking an adenosine moiety at C16, that projects into the NADPH binding site ⁵.

- Substitutions at C15: there are described large alkyl spacers linked to C15 that bear polar moieties, like an amide, ester, carbonyl, hydrazone, alcohol, ether, urea, carbamate, retroamide, sufonyl urea, sulfamide, sulfamate, retrosulfonamide, retrocarbamate, retroester or a sulfonylcarbamate type side chain; can be found combined with substitutions on C2 and C3, or on the steroids with an E ring ^{13,17,26,32}.

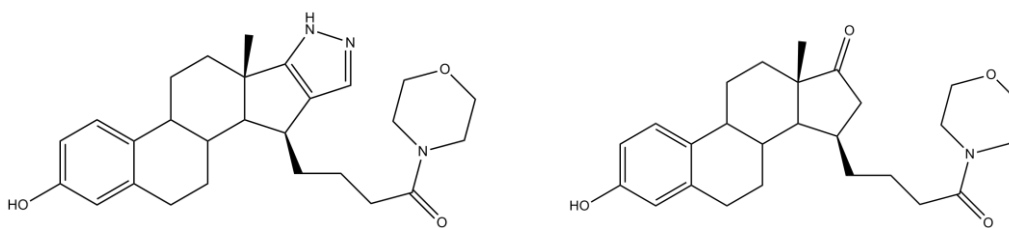
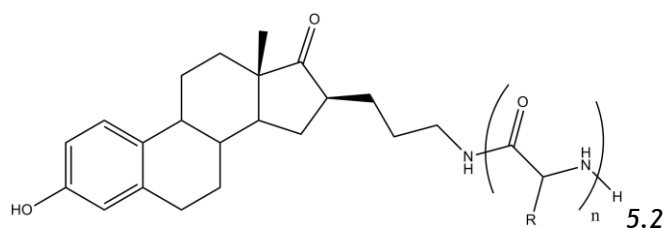
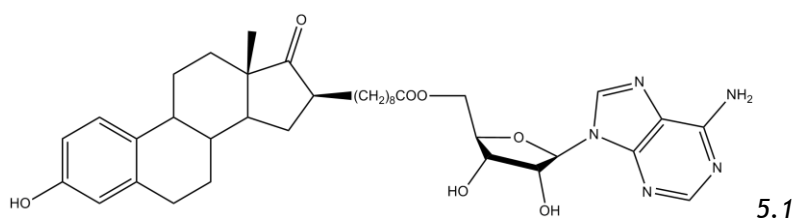


Figure 1.8 - Examples of C15-substituted estrogens

- Substitutions on C16: one of the most common substitutions, that includes some irreversible inhibitors: ones with bromine in their composition of the chain, suicidal inhibitors (16-methylene substituted and with an α -hydroxyacetylenic substitution) and alkylating inhibitors (processing a bromine in the end of an alkyl chain, working as a good leaving group). They are well tolerated, especially β -substitutions, and can present a dual activity: ER antagonists and inhibitors of 17 β -HSD-1¹⁷. We can find small or large substitutions on C16 - the large substitutions can interact with the co-factor (NADPH) at the active site of the enzyme, and the presence of a good leaving group at the end of the chain lead to good inhibition results. We can also find halogenated substitutions on this position (suicidal inhibitors). This group also includes different hybrid compounds that interact with the cofactor and are very potent inhibitors, although reversible, these hybrid structures can have large alkyl spacers (the optimal being 8 methylene groups) bound to C16, and to an the adenosine moiety (5.1), or a partial mimic of adenosine moiety, a *meta* substituted aniline (the simplified hybrid adenosine compounds(5.4), like *m*-carbamoylbenzyl or just carbamoyl substituent (5.3) in 16 β -position), and other kind of compounds, whose spacers consists in amides linked to sulfamates or phenols (the peptide derivatives) (5.2) ^{17,26,33,34}.



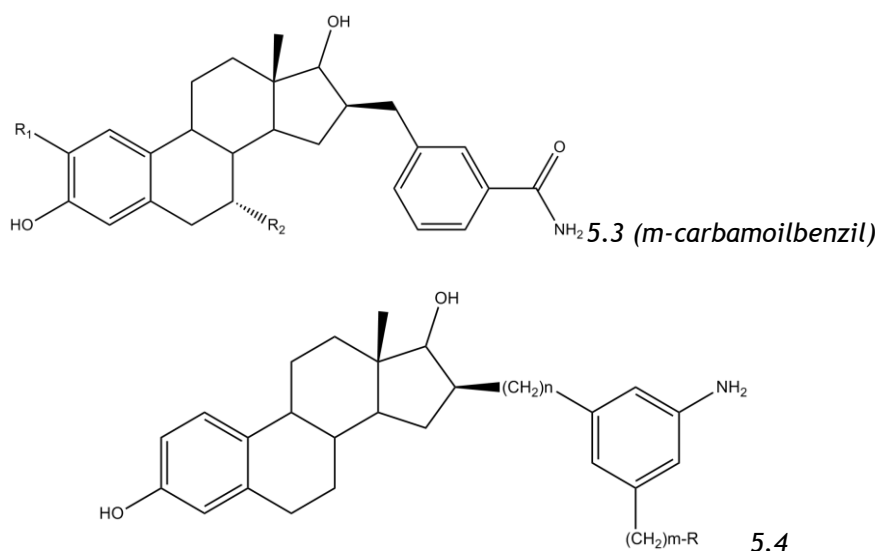


Figure 1.9 - Examples of C16-substituted estrogens. The compounds are examples of hybrid inhibitors.

- Substitutions at C17: among others, include the 17-fluoro substituted estrogens- the Fluor can mimic the hydroxyl or carbonyl moieties because of its large electro-negativity and hydrogen-bond acceptor capacity, and is found combined with substitutions on C14, C15 and C16, as well as C2, and with double bonds on C8 and C9^{26,11}. Some substitutions including NO-R moiety are also described for estrogen derivatives³⁴. 17 β -Formamido, 17 β -benzamido as well as 17 β -amino derivatives can be found in non-estrogenic molecules, and are associated with effective inhibition¹⁷. The most common is to find the carbonyl moiety in C17, that mimics estrone, or the OH moiety, that mimics estradiol.

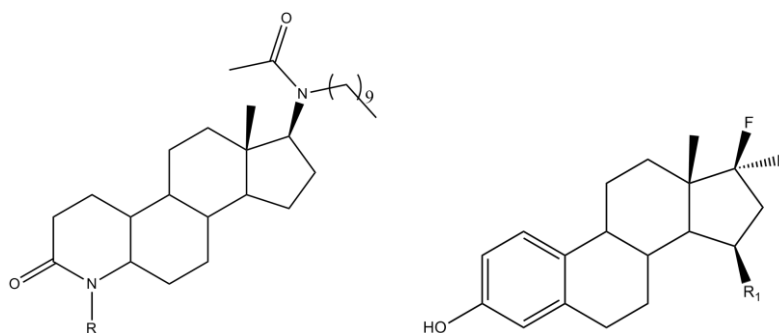


Figure 1.10 - Examples of C17-substituted compounds.

- D-Homo derivatives: A new kind of inhibitors that present a 6-membered D-ring which proved to be very active^{14,17,18,26}. They are presented along with substitutions on C2 and in other places.

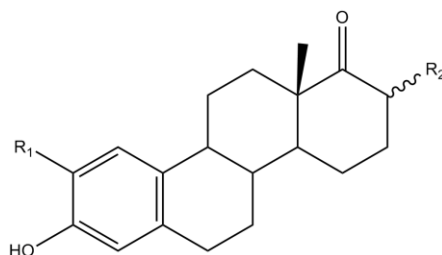


Figure 1.11 - General structure of a D-homo estrogens with substitutions on C2 and C16.

Other inhibitors present a heterocyclic E-ring, with 5 or 6 members, the bests presenting a pyridyl side-chain linked to it (Figure 1.12).^{17,26,34}

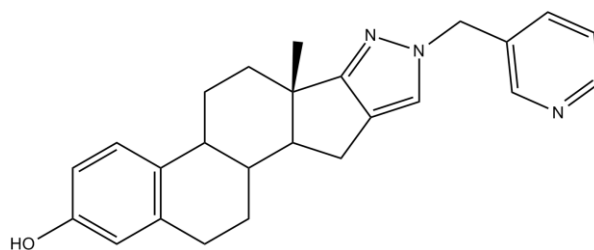


Figure 1.12 - Example of an estrogen with an heterocyclic E-ring, linked to a pyridyl moiety.

Finally, tibolone (a 19-nortestosterone steroid) (Figure 1.13) derivatives, whose metabolites have different binding affinities to estrogen, progesterone and androgen receptors, and enzymes involved in their metabolism.

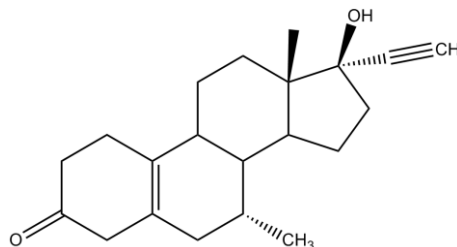
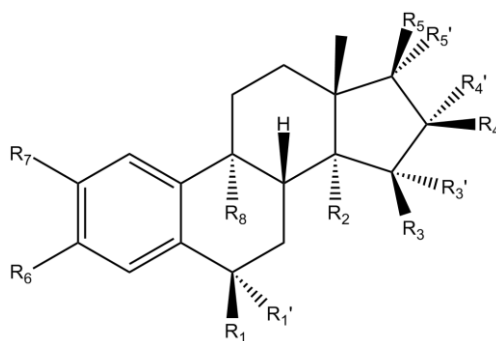


Figure 1.13 - Tibolone structure.

Table 1.1 resumes this information into a general SAR structure:



R1 or R1' (C6)	S or O or CH ₂ (CH ₂) ₅ CONBuMe; O;
R2 or R2' (C14)	CH ₃ ;
R3 or R3' (C15)	CH _{2(n)} CONR'; CH _{2(n)} OH; CH _{2(n)} OCONHR', etc.
R4 or R4' (C16)	NOH; CH ₂ R; CHOH; OCH ₂ CH ₃ ; CN; CH _{2(n)} OAdenosine; etc.
R5 and R5' (C17)	F; O; OH
R6 (C3)	OH; OMe; OCH ₂ Ph; SO ₂ NH ₂ ; SO ₂ OH, etc.
R7 (C2)	Cl, Br, OCH ₂ R, I, Me,
R8 (C9)	CH ₃

Further efforts need to be done, with the aim of reducing or abolishing the estrogen activity of these compounds, this is, the development of compounds with good inhibitory action, but with a low estrogenicity.

The promising compounds D-homo 2-substituted were the basis of our work. Moller *et. al.* studied on 2009 the importance and excellent results on 17 β -HSD-1 inhibition relying in these compounds¹⁸. The importance on 2-substitution is based on the fact that it is oriented to an unoccupied lipophilic sub-pocket, consisting of the side-chains of Val143, Met147, Phe259, Leu262 and Met279. In addition, 2-substitutions lower the intrinsic estrogenicity of the molecule. These molecules presented impressive results, with percentages of inhibition varying from 86 to 100% at 2 μ M, and IC₅₀ in the nanomolar values (from 15nm to 126nm). Their homologues with a 5 membered D-ring, have inhibitions between 70 to 99% at 2 μ M, and IC₅₀ from 35nm to 553nm. Basically, inserting a 6-membered D-ring on the estrogens, significantly improved the inhibitory properties and consequently, a lower amount of substance needed to totally inhibit the enzyme (lower IC₅₀). In the synthesis, it was observed that the transformation of a 5-membered D-ring into a D-homo estrogen presented by the authors requires a complex synthesis pathway, with three steps and an unfavorable total yield. Our idea relies on building a 6-membered D-ring by a single step - the lactonization of D-ring by a Baeyer-Villiger (BV) reaction in 2-substituted estrogens (**Figure 1.14**). A lactone ring may, however, present a different activity compared to a D-Homo ring, due to the electronic density associated to the two oxygens. The lactones that we proposed to test and synthesize are called Westerfeld lactones, while are available a variant of this lactone, the Jacobsen's lactone³⁷.

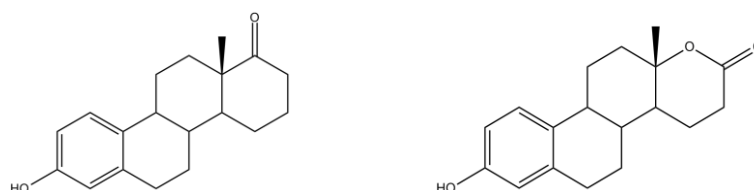


Figure 1.14 - Comparison of D-homo estrone with the D-lactonized estrone (Westerfeld's lactone - estrolactone) respectively.

1.1.3 Drug design and discovery - the importance of computational methods: molecular docking and *in silico* toxicity studies

By the last 30 years, drug development and research has grown and developed, partially thanks to the introduction of new computational methodologies in the field of chemistry³⁸. The so called chemoinformatics is a term introduced on 1998 by Dr. Frank K. Brown, and described by him as: “*The use of information technology and management has become a critical part of the drug discovery process. Chemoinformatics is the mixing of those information resources to transform data into information, and information into knowledge for the intended purpose of making better decisions faster in the area of drug lead identification and organization*”^{39,40}.

With all the advances in the field of chemoinformatics being so important in the knowledge and global share of the information about several biological molecules and processes, serendipism is playing a less important role nowadays on drug discovery, although some examples may break this rule (e.g.: the discovery of sildenafil). The advance in the field of crystallography and NMR (Nuclear Magnetic Resonance) in molecular biology, and the creation of the Protein Data Bank (PDB), is very important to the success of some methodologies around the chemoinformatics. In fact, in PDB, thousands of proteins, most being involved and playing a major role in pathologies, can be found and are accessible to anyone, especially for use in the docking methods, where a file of a macromolecule is needed to perform the tests^{38,39,40}.

1.1.3.1 (Q)SARs and *in silico* studies

The basis of chemoinformatics relies on predicting the activity for some molecule: knowing which particular effects brings to a particular biologic system, we can then attempt to know and form a quantitative relationship between the biological activity and the structure of the chemicals - this leads us to the term QSAR - quantitative structure-activity relationship. QSAR quantizes features of the new chemical structure so that overall properties of the compound can be predicted based on the relationship between structure and activity computed using the knowledge derived from a training set. Together with SAR (which doesn't accomplish the quantitative but only involves qualitative information) we can refer about (Q)SARs, which is involved in a series of techniques known as *in silico* approaches³⁹. It is being applied on drug discovery including in toxicity prediction, risk assessment, lead optimization, prediction of oral bioavailability, blood brain barrier crossing, pharmacological target prediction, and even in other fields. These approaches are becoming relatively important in the pharmaceutical industry, especially identifying lead compounds for further tests relying in drug discovery^{10,41}. The term *in silico* toxicology generally refers to a computational experiment, mathematical calculation, or scientific analysis of substances and organization of substance related data to assist in predictive toxicological and pharmacological profiling of chemical substances for understanding drug safety liabilities⁴¹. All these *in silico* approaches work as

predictive or filtering tools. However, they need to be confirmed by experimental testing. (Figure 1.15).

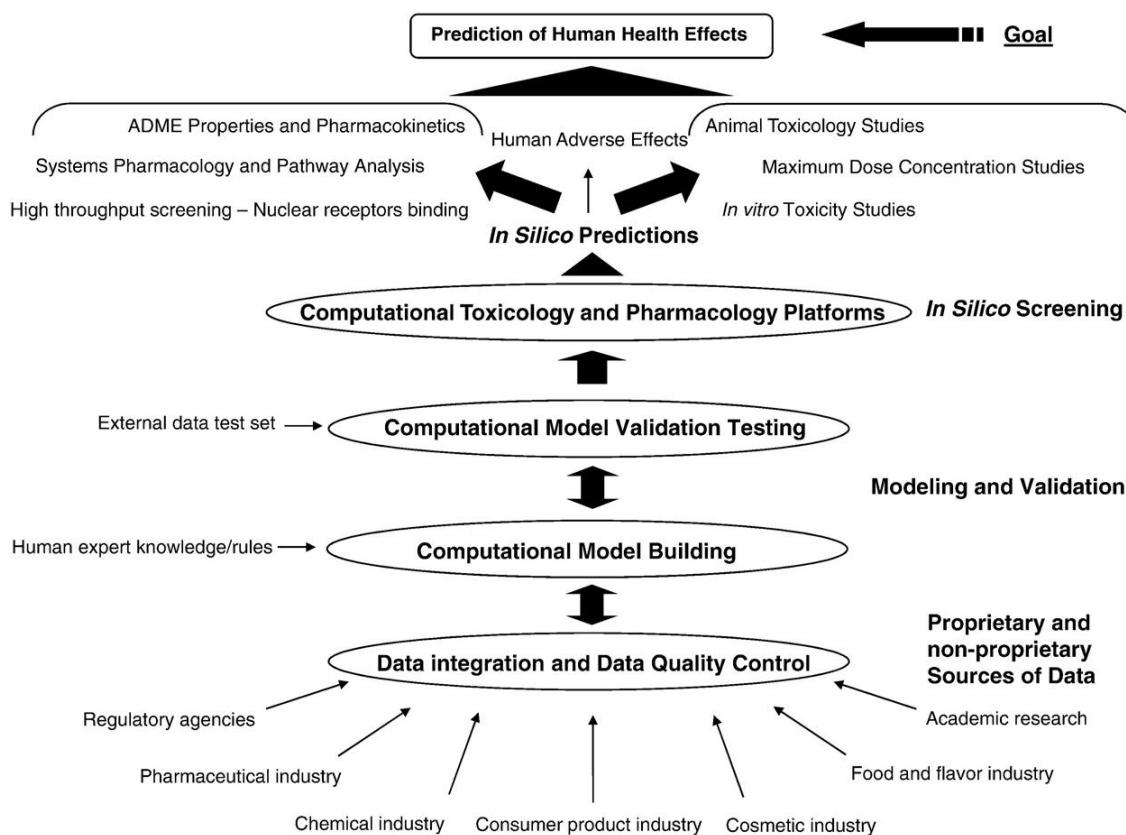


Figure 1.15 - Workflow for the use of drug and chemical toxicity databases and models; starting from the source of data to the goal of predicting human health effects. Adapted from Luis G. Valerio Jr. ⁴¹

1.1.3.2 Molecular Docking

In computational methods in drug discovery and development, we can find the Molecular Docking (referred here as Docking) method³⁹. Docking consists on the search for spatial arrangements that fit two molecules together in energetically favorable configurations, and enables the prediction of the binding free energy of the complex (the binding affinity). Docking, thus, is ultimately interested in reproducing chemical potentials, which determine the bound conformation preference and the free energy of binding, as well as giving a three dimensional (3D) structure of the protein and the ligand molecule ^{38,42}. Docking calculations explores enthalpic and entropic contributions, components of molecular interactions that lead to the final free energy of binding (ΔG). Enthalpic contributions includes electrostatic interactions (ionic bonds, charge-dipole and dipole-dipole interactions, (inductive interactions provided by intra-molecular contributions from the complex formed), dispersion forces (responsible for attractive interactions between non-polar molecule) and hydrogen bonds) and steric interactions (short-range repulsive forces), while entropic contributions are composed by translational and rotational energy (which means an

interference in the degrees of freedom of the ligand after the formation of the ligand-receptor complex), hydrophobic effect and solvent reorganization.⁴³

Virtual Screening (VS) is a term directly connected to the Docking method. In contrast to High Throughput Screening (HTS), which consists in the search for hundreds or thousands of previously synthesized compounds of interest that bind to a target molecule in real conditions, VS performs this search by computational means, recurring to Docking, suggesting then computer hits³⁸. A great approach and use of VS is to perform a filter to a series of compounds, providing those who hit the target to be further synthesized and further evaluated by HTS assay. This attitude links to the concept of Green Chemistry, allowing less materials being wasted on the synthesis of compounds that were unlikely to have the wanted activity. Also, VS is a cheap and fast methodology^{38,44}.

To perform docking, usually the 3D structure of the target needs to be known and available by crystallography or NMR^{38,44}. This reveals a difficulty for some targets, as G-protein-coupled receptors, for which remains impossible, or remarkably difficult to crystalize or obtain structural information^{38,42}. Nevertheless, docking is, as described above, a very important methodology in drug design, as it can direct experimental efforts based on ligand-receptor binding predictions. In fact, a great number of drugs have been developed using docking methods at some stage of development. Thus, with the new advances on computer technology and the increase of the number of receptor structures in PDB and algorithm development allowing the creation of more accurate docking methods, evolving flexible ligands to complex with uncomplexed receptor structures, the future will promise that docking will be involved in even more drug design processes⁴².

1.1.3.2.1 Docking software

In our work the docking software that has been used is the AutoDock Vina, an automated docking tool developed at The Scripps Research Institute, Molecular Graphics Laboratory, USA³⁵. This software only performs docking of one single molecule at time, thus, it cannot perform VS tests. Unlike AutoDock 4.0 (the version available before the development of Vina), who uses as a docking method a genetic algorithm, to explore the full range of conformational flexibility and the rotational flexibility of selected receptor hydrogens, Vina uses an Iterated Local Search global optimizer^{35,38,45}. Iterated local search (ILS) is a method that generates a sequence of solutions generated by an embedded heuristic, leading to far better results than if one were to use repeated random trials of that heuristic. In this algorithm, a succession of steps consisting of a mutation and a local optimization are taken, with each step being accepted according to the Metropolis criterion. Mutation, or active site mutagenesis, is a measure of intrinsic binding energy based on the anchor principle, where the impact of a single amino acid substitution in the active site is measured in terms of catalytic efficiency or inhibitor binding⁴⁶. The algorithm can be improved by iterations (the act of repeating a process usually with the aim of approaching a desired goal or target or

result)⁴⁶. That's one of the functions that the user can decide: the higher the number of iterations, the longer is the search, but the results given are more accurate. Nevertheless, this new version gives more accurate and quick results comparing to the old version of AutoDock. Both treat the receptors as rigid, and the ligands as flexible molecules - this is remarkably important, given that the conformation a ligand adopts in solution is not necessarily the one it will adopt when bound to the target³⁸. Necessary to work, Vina requires a readable molecule and macromolecule saved in *.pdbqt file format, derived from *.pdb format with additional information: it stores the atomic coordinates, partial charges and AutoDock atom types⁴⁷, and also information about the spatial search, thus requiring a grid box special coordinates, as we will describe further.

We can find different docking software, each one accomplishing specific docking and scoring methods, also known as docking and scoring functions, and different functionalities. Some of those are able to perform VS to hundreds or thousands of molecules presented. Respecting to the Scoring Function, it must obey to the thermodynamic and kinetic requirement - the complex must be the global minimum of the binding energy landscape, but at the same time this conformation must be accessible during the search³⁸. It is used to estimate the energy of a given protein-ligand arrangement, attempting to approximate the standard chemical potentials of the system, and it is the most important feature of a docking program^{38,48}.

1.2 Objectives

In this work, the objectives proposed were: to perform docking studies with AutoDock Vina to some estrogen derivatives into the macromolecule 17 β -HSD-1, with the aim of finding compounds with high affinity to this enzyme, and also perform *in silico* toxicological studies with these molecules; to develop and synthesize some estrogen derivatives with special attention to the 2-substituted estrone derivatives and its lactonized D-ring homologues to be further evaluated in *in vitro* inhibitory assays.

We then expect that estrone derivatives with the 6-membered lactonized D-ring present higher affinity values in docking studies than the ones with a 5-membered D-ring. Also, we will confront the docking affinity studies and *in silico* toxicological studies of these lactonized compounds to their D-Homo homologues in order to find similarities or discrepancies on the results.

1.3 Materials and Methods

1.3.1 Computational studies

As previously referred, the docking experiment approached here is a semi-flexible docking, where the macromolecule was treated as a rigid body, while the ligands were treated like flexible bodies.

1.3.1.1 Software

The software used for the creation of the 3D (three-dimensional) molecules that would work as ligands in the docking studies was Chem3D v 12.0 software (Cambridge ChemBioOffice 2010).

For the preparation of the ligands (choose torsions and detecting aromatic carbons), macromolecule and construction of the Grid box, was used AutoDock Tools v 4.2 in MGM tools from The Scripps Research Institute.

The software used for adding the hydrogens to macromolecule, and to visualize the docking results including polar contacts was PyMol (The PyMol Molecular Graphics System) v 1.3 built to educational use.

The docking software used for the calculations was AutoDock Vina³⁵. It is a free new software as related before in our work, and it's been used by some authors to perform docking searches nowadays.^{49,50}

1.3.1.2 Preparation of the Ligands for molecular Docking: 3D molecular structures, minimizing energy and file formats

3D structures of the molecules used in docking studies were constructed with the aim of Chem 3D, where the optimal conformational state was achieved with a modified version of Allinger's MM2 force field. Molecular mechanics (force field) is a method for the calculation of molecular structures, conformational energies and other molecular properties, using concepts from classical mechanics^{35,53}. It thus includes computation of Bond Stretching Energy, Angle Bending Energy, Torsion Energy, Non-Bonded Energy, Van Der Waals Energy (including cutoff parameters to improve the computational speed of calculations), Electrostatic Energy, charge/charge, charge/dipole and dipole/dipole contribution, Out of Plane (OOP) Bending, Pi Bonds and Atoms with Pi Bonds and Stretch-Bend Cross Terms⁴³. From a pre-established optimized steroid nucleus geometry, the MM2 jobs were run until reached an gradient norm lesser than the minimum gradient norm (Root Mean Square [RMS] Gradient set of 0.010). The results of MM2 calculations were given by Total Energy in kcal/mol, and the molecules saved in *.pdb format with the geometry acquired by this calculations.

Additional conversion of the *.pdb format to *.pdbqt format was achieved in AutoDock Tools. The later provides the storage of the atomic coordinates, partial charges and AutoDock atom

types for further use on docking calculations by AutoDock Vina. This format also stores information about aromaticity and rotatable branches, which can be set on AutoDock Tools, if not performed automatically.

1.3.1.3 Choosing and preparing the macromolecule for docking experiments

Until 2010 there have been crystallized by X-Ray Diffraction several structures of 17 β -HSD-1, which are available on Protein Data Bank (PDB) website⁴⁵. However, to choose the adequate structure which will lead to a reliable computational study, we have to consider some important information such as the crystal resolution, source of the enzyme, presence of water molecules (directly influenced by the resolution) and the ligands or co-factors crystallized within the macromolecule. The molecule chosen was proposed by M. Mazumdar *et al.* (PDB code of 3KM0), and comprises the 17 β -HSD-1 in complex with 5- α -androstane-3- β , 17 β -diol and NADPH, isolated from human placenta with a resolution of 2.30Å. This is the most recent crystal of 17 β -HSD-1 added to PDB database until now (12-06-2012), and the fact of having an human origin is relevant for our studies.

After choosing the most appropriate macromolecule, it was relevant to prepare it for the docking studies: add the Hydrogen atoms to residues and water molecules (performed with PyMol), remove the ligand that was co-crystallized with the macromolecule and define the Histidine charges to match the human physiologic environment (monoprotonated state³⁸). The former is a very important step, as the crystal lacks all the hydrogen atoms. Also, the water molecules are very important to establish interactions between the ligand and the residues on the binding pocket, as they can turn some hydrogen acceptors residues to work as hydrogen donors, and the reverse³⁸. So, regarding the importance of these moieties, the water molecules existent in the crystal, especially the ones near the pocket, were allowed to stay, giving higher affinity values. Before removing the ligand, we can take in account a precious information: the binding pocket location - crucial to the generation of the grid-box. Finally, AutoDock Tools performed corrections on amino-acids and global charges (gasteiger and Kollman charges), and merged the non-polar hydrogens. We allowed NADPH to stay, in order to better mimic the natural environment of the enzyme.

1.3.1.4 Grid-Box

The grid box is a way to identify the coordinates and spatial location of the binding pocket. The software AutoDock Tools generates a three-dimensional box within the macromolecule, which needs to be resized and placed over the desired pocket. Therefore, the presence of the ligand co-crystallized with the macromolecule in the pocket is very helpful for the accurate identification of the pocket. The software provides the values of space location of the center of the box and the box size (number of points in each dimension). Dimensioning the grid box to the approximate size of the pocket has only the purpose of reducing the time of calculation and number of iterations, thus assembling the computations more quickly and

accurately. The spacing of 1Å equals the distance of a C-C bond, and provides a bigger grid box without the need of too many points in each dimension. The information acquired after generating the grid box, is written down on the configuration parameters of the software AutoDock Vina for the macromolecule in use, so that the software knows in where in the molecule to perform the docking calculations.

Grid Box for 3KM0.pdbqt:

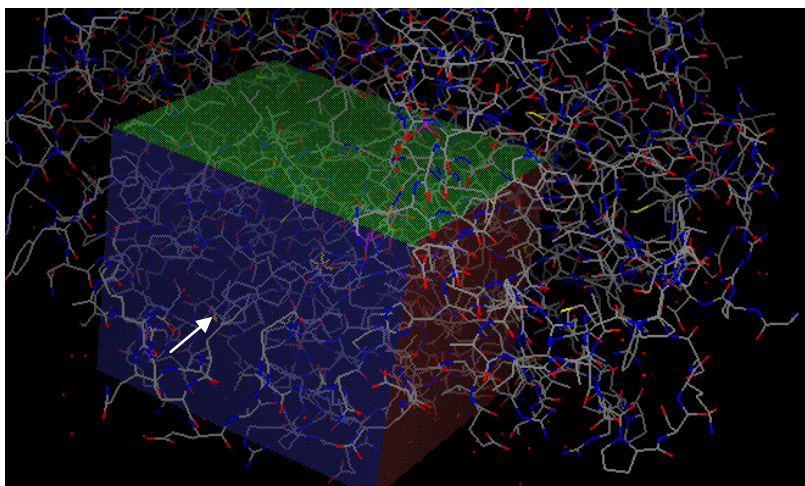


Figure 1.16 - Grid Box for 3KM0.pdb. This image was created with AutoDock Tools. Arrow indicates the location of the ligand co-crystallized on the binding pocket. Below is the information about spatial location of the gridbox.

Table 1.2. Grid parameters			
Spacing: 1Å			
Dimension:	Number of points in dimension:	Center:	Offset:
X	25	21.185	2.889
Y	20	-2.672	-3.583
Z	20	- 11.932	12.025

1.3.1.5 Testing the accuracy of docking experiments

To know if the software is performing accurate docking experiments there is a very simple but reliable test that consists in docking the ligand crystallized with the molecule^{51,52}. If the docked molecule lies superimposed with the crystallized molecule, with no more than 2Å distance, the software is accomplishing good docking calculations^{38,51,52}. In this case, AOM (5- α -androstane-3-B) was identified and isolated from 3KM0, saved as a ligand with *.pdbqt format in AutoDock Tools, and then subject to a docking computation. Superimposing the results, one find that the best match lies on the fourth best affinity mode, with distances ranging from 1Å to 1.8Å. In the best affinity mode proposed by AutoDock Vina, the atoms that match have distances ranging from 3.4Å to 11Å.

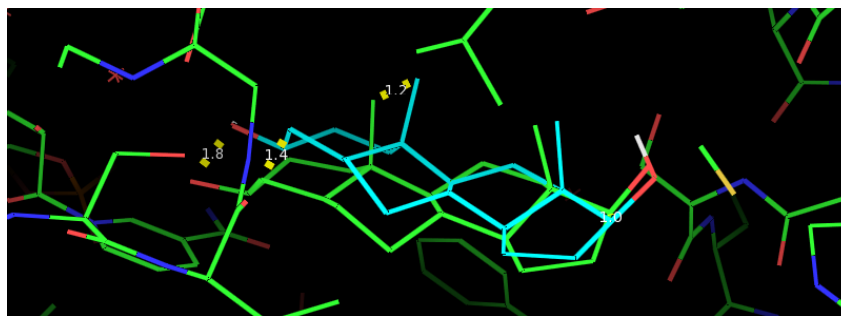


Figure 1.17 - Superimpose of the docked ligand (cyan) and the crystalized ligand (green) in the binding pocket in affinity mode 4. This image was created with PyMol.

Nevertheless, the molecule fits in the same place where the ligand lies, in any affinity mode. As we can't predict which docking affinity mode will match the real interaction mode, we will assume an average of the first four affinity values given by the software in our results, presenting also the best affinity mode value. The result presented by the fourth affinity mode proves us that the software is reliable on the docking results. It is important to mention, that in the majority of the docked results, the first affinity result presents the interactions with the molecule and adjacent amino-acids suggested by numerous authors as discussed before in the introduction: these include the interactions with Tyr155 and Ser142 with the carbonyl at C17 of estrone and its derivatives, and interaction with 3-OH and Hys221.

1.3.1.6 Docking results

The exhaustiveness selected of the calculations was the default (exhaustiveness=8). Results of docking in AutoDock Vina are presented in free energy of binding (ΔG) in kcal/mol, and clustered using a RMSD (root mean square deviation) cutoff value. RMSD values are calculated relative to the best mode and use only movable heavy atoms. Two variants of RMSD metrics are provided, rmsd/lb (RMSD lower bound) and rmsd/ub (RMSD upper bound), differing in how the atoms are matched in the distance calculation - the best configuration mode possesses rmsd/lb and rmsd/ub = 0.^{47,53,58}

As related by the developers of the software, the predicted free energy of binding is calculated from the intermolecular part of the lowest-scoring conformation, designated as 1, where the function g can be an arbitrary strictly increasing smooth possibly nonlinear function (1). C represents the contributions of intra-molecular or intermolecular interactions^{47,48}.

$$s_1 = g(C_1 - c_{intra1}) = g(c_{inter1}) \quad (1)$$

The output values are given in order to the best configuration mode, and the distance between the best configuration mode are presented in armstrongs (\AA) to preserve the ranking. Free energy of binding of the other low-scoring conformations uses c_{intra} of the best binding mode:

$$s_j = g(C_j - c_{intra1}) \quad (2)$$

1.3.1.7 *In silico* toxicity studies

The *in silico* toxicity studies were performed with the tools provided at The Organic Chemistry Portal (www.organic-chemistry.org) with OSIRIS Property Explorer. Molecules were designed directly on the program and then the values observed.

1.3.2 Materials used on chemical synthesis

1.3.2.1 Reagents and solvents

All synthesis were performed with reagents and solvents used as received. Estrone, used as substrate on the majority of the following reactions, as well as MCPBA (*m*-chloroperoxybenzoic acid), sodium bicarbonate (NaHCO₃) and anhydrous sodium sulfate were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium iodide (NaI) was acquired to Applichem, methanol was purchased to Normapur, glacial acetic acid and sodium chloride were purchased to Panreac, chloridric acid 37% (HCl) was acquired to Merck, sodium thiosulphate (Na₂S₂O₂) was purchased to Fluka, Cooper(II) chloride di-hydrate was acquired to Riedel-de-Haën and nitric acid (HNO₃) was purchased to Probus, S.A. Badalona.

All other solvents used were of adequate grade for chemical synthesis and purification: petroleum ether (PE), ethyl acetate (EA), diethyl ether and dichloromethane were acquired to Fisher Chemicals.

1.3.2.2 Chromatography

All chemical reactions were controlled by TLC (Thin Layer Chromatography), using commercial silica gel plates (silica gel 60 with a fluorescent indicator UV₂₅₄) purchased to Mecrk/Macherey-Nagel. After the application of the compounds in the plates, elution was performed with an appropriate mixture of eluents in different proportions, as demanded by the kind of product/substrate, and then the plates were observed under UV light (254nm). They were posteriorly revealed by a solution of ethanol/sulphuric acid (95:5), followed by heating at 120°C.

Column chromatography, in order to isolate and purify the products obtained on each reaction, were performed using Silica-gel 230-400 mesh, purchased from Merck, the eluent being described further for each reaction.

1.3.2.3 Equipment and other devices

The solvents were evaporated by using a rotary vacuum drier, from Heidolph.

The UV₂₅₄ revelator was model CN-15.LC.

RMN spectra were obtained by Bruker Avance III 600 spectrometer, and registered at 600 MHz for ¹H RMN and at 151 MHz for ¹³C RMN, using CDCl₃ as a solvent.

1.3.3 Experimental process

1.3.3.1 Baeyer-Villiger reaction of Estrone

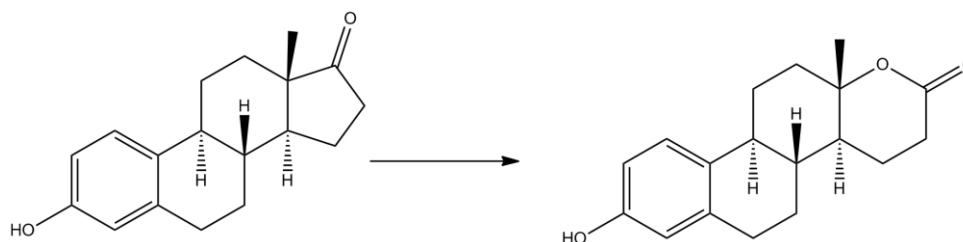


Figure 1.18 - Schematic representation of Baeyer-Villiger reaction

Estrone (67,59mg, 0.25mmol) was added to a round bottom flask, followed by 2ml of dichloromethane and after dissolution MCPBA (112,06mg, 2eq., purity of 77%) was slowly added. The mixture was left under magnetic stirring for 41h at room temperature, and the reaction was controlled by TLC. A new amount of MCPBA (56.3mg) was added after 40h. Over the time reaction acquired a pale yellow color. According to the TLC two main products with UV absorption were obtained (PE/EA 1:1), with R_f of 0.325 and 0.575, and some estrone wasn't consumed.

After stopping the reaction, the mixture was extracted with 50ml of diethyl ether, and the resulting organic layer was washed with 20ml of saturated aqueous sodium bicarbonate solution, and washed again with 20ml of water. The resulting organic solution was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated under vacuum. An oil product was obtained (74,6mg).

This oil product was subjected to column chromatography (PE/EA gradient, starting with 2:1 ratio and ended with 1:1 ratio), and the two main products were isolated, the most polar isolated with an amount of 8.5mg and the less polar one being isolated in greater amount (14,4mg).

The two products were subjected to analysis in ¹H NMR and ¹³C NMR. Both products presented signals at 220ppm in ¹³C NMR, suggesting that none of them was our wished product.

1.3.3.2 Iodination reaction of Estrone with Sodium Iodide and Sodium Chlorite

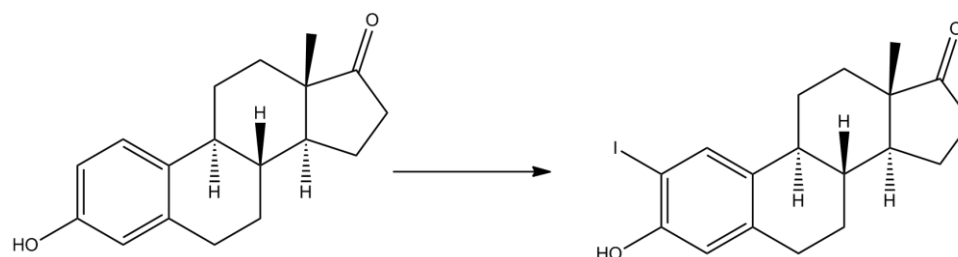


Figure 1.19 - Schematic representation of iodination reaction

As described by the authors of this process (A. Napolitano)⁵⁴, this reaction, using 0.5 equivalents (eq) of sodium chlorite and 0.5eq of sodium iodide, leads to selective C-2 substitution, being the product of reaction 2-iodoestrone. It is also referred by the authors that using 4eq of sodium chlorite and 8eq of sodium iodide 4-iodoestrone and 2,4-diiodoestrone are formed with absence of 2-iodoestrone.

Sodium Chlorite (14.13mg, 0.5eq) and Sodium Iodide (18.74mg, 0.5eq) were added to a round bottom flask, and then, 12.5ml of water. This mixture was allowed to stir until solubilization and then 12.5ml of methanol was added. Finally, estrone (67.59mg, 0.25mmol) was added, followed by a quick addition of 62 μ l of HCl 37% (12M). A vivid yellow color was formed which is readily transformed to a pale rose solution. This solution was allowed to react for 2 hours under vigorous stirring at room temperature, and was controlled by Thin Layer Chromatography (TLC) (eluent PE/EA 2:1). After 2 hours, the control by TLC showed the presence of a more hydrophobic product (2-iodoestrone), with $R_f = 0.66$ and non-consumed estrone, with $R_f = 0.51$.

The reaction was stopped, and the resulting mixture was extracted with 105ml of EA (40ml + 30ml + 35ml). The organic layer was washed with about 10ml of sodium thiosulfate (10g/l) aqueous solution until the yellow color disappeared, and then dried with anhydrous sodium sulfate and filtered. The resulting organic solution was allowed to evaporate with vacuum, and an amorphous white solid was obtained. This white solid was subjected to column chromatography (eluent: PE/EA, 4:1), and a pure product was obtained (26.6mg, yield = 13.4%) as a pale yellow solid.

Analysis of the product obtained by column chromatography ¹H-NMR spectra (CDCl₃) showed, among others, several characteristic signals at 7.62ppm (1H, singlet, C1), 5.79 ppm (1H, singlet, C-4) and a signal presented by CH₃-18 (singlet, at 0.89ppm). ¹³C-NMR spectra (CDCl₃) presented values at δ : 220.6, 151.54, 140.66, 135.87, 92.01, 78.37, 50.20, 47.76, 43.96, 37.40, 37.11, 35.87, 31.42, 29.72, 27.23, 26.19, 21.52, 13.75. The signals are in agreement with those previously described by other authors for this compound.^{54,55}

1.3.3.3 Iodination reaction of Estrone with Iodine and Copper (II) chloride dihydrate (CuCl₂.H₂O)

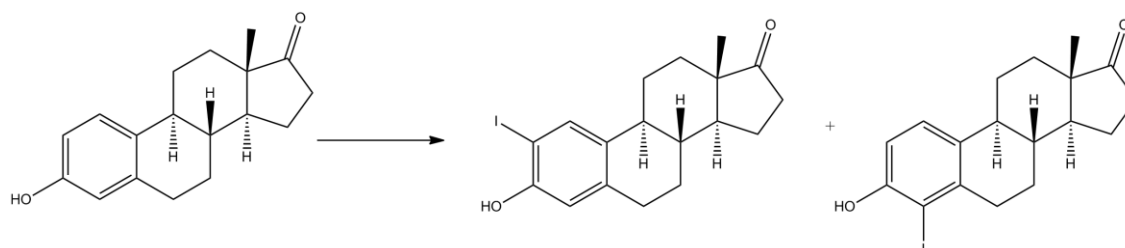


Figure 1.20 - Schematic representation of iodination reaction to afford both 2 and 4-iodoestrone

This reaction, developed by M. Cushman *et. al.*⁵⁶ differs from the former as it led to the formation of 2-iodoestrone and 4-iodoestrone, with complete consumption of substrate, and absence of 2,4-diiodoestrone.

Here, CuCl₂.H₂O (0.375mmol, 63,93mg) was added to a round bottom flask, followed by quick addition of iodide (0.375mmol, 95,265mg) and 7ml of glacial acetic acid. Then, estrone (0.25mmol, 67,59mg) was added to solution, and the reaction was allowed to react at 60°C, under vigorous stirring and N₂ atmosphere (balloon), for 35h. The reaction acquired a reddish color.

After consumption of the substrate, the reaction was stopped and the mixture was washed with 10 ml of brine, and then extracted with diethyl ether (20ml + 30ml + 10ml). The yellow color on organic layer was removed by washing with 10ml of sodium thiosulfate (10mg/l) aqueous solution, and then this layer was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and evaporated in vacuum. A white solid was obtained.

In the reaction, it was observed by TLC that estrone was totally consumed. The resulting products, 2-iodoestrone and 4-iodoestrone have very close R_f values (0.85 and 0.72 with eluent EA/PE 2:1), and the separation of these two products by column chromatography was difficult. The eluent used for column purification was toluene/diethyl ether 4:1. The difficulty in the separation of these two isomers led us to choose the method formerly described for the iodination of estrone.

1.3.3.4 Nitration reaction of Estrone with Nitric Acid

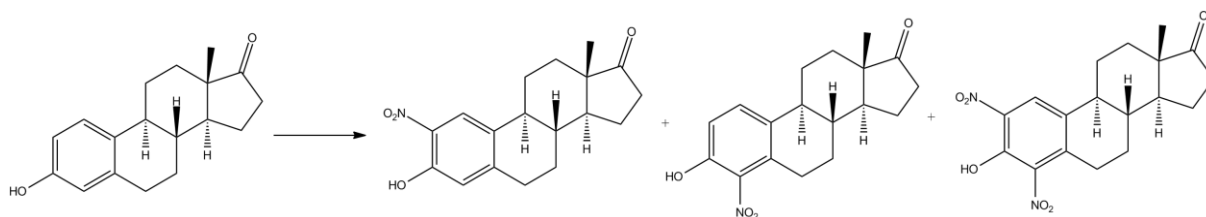


Figure 1.21 - Schematic representation of nitration reaction

This reaction was performed as a modified version of G. Stubenrauch *et. al.*⁵⁷. Estrone (270.37mg, 1mmol) was added to 8.13ml of acetic acid in a 50ml round bottom flask and the suspension formed was allowed to stabilize at 50°C with vigorous stirring. Then, a solution of nitric acid (88.37 μ l, 1.2eq, 62 % purity) in acetic acid (270.26 μ l) was added. The brown-reddish clean solution was allowed to react overnight under vigorous stirring, at room temperature. After 13h, the reaction was controlled by TLC, using PE/EA 2:1 as eluent, and 4 products with UV₂₅₄ absorption were identified. The wanted product, 2-nitroestrone and 4-nitroestrone, with R_f = 0.65 and 0.50 respectively, were isolated after workup and chromatographic separation.

After 13h, the reaction was stopped and the mixture extracted with 150ml of EA (50ml + 50ml + 50ml). The organic layer was washed with saturated aqueous sodium chloride solution (brine), saturated aqueous sodium bicarbonate solution and water. Then, the organic layer was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and allowed to evaporate under vacuum, and a brownish solid was obtained. This product was subjected to column chromatography (eluent: gradient of PE/EA, 3:1; 1:1 and 1:3), and pure 2-nitroestrone (yellow solid, 112.6mg, yield = 35.7%), along with a mixture of 2-nitro and 4-nitroestrone was obtained.

The analysis of the pure product obtained by column chromatography by $^1\text{H-NMR}$ spectra (CDCl_3) showed, among others, a signal presented by $\text{CH}_3\text{-18}$ (singlet, at 0.92ppm), and signals at 10.42ppm (1H, singlet, OH), 7.99ppm (1H, singlet, C-1, due to NO_2 electron-withdrawing effect) and at 6.88ppm (1H, singlet, C-4). $^{13}\text{C-NMR}$ spectra (CDCl_3) presented values at δ : 220, 152.90, 148.90, 133.12, 131.02, 121.56, 119.04, 50.37, 47.82, 43.49, 37.74, 35.77, 31.27, 29.61, 25.94, 25.73, 21.54, 13.77; all these values are confirmed by previous data and structural elucidation obtained by Enzo Santaniello *et.al.*, Banik *et.al.*, and Amir Wahba *et.al.*^{36,58,59}, evidencing the successful preparation of 2-nitroestrone.

1.3.3.5 Baeyer-Villiger reaction of 2-nitroestrone

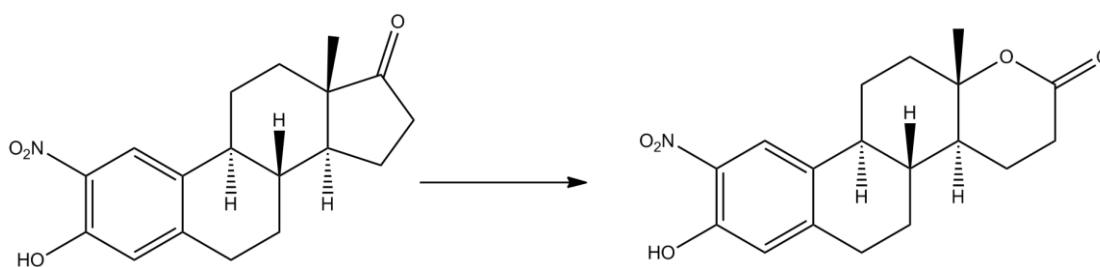


Figure 1.22 - Scheme of Baeyer-Villiger reaction for 2-nitroestrone

2-nitroestrone (47.3mg, 0.15mmol) was added to a round bottom flask followed by 1.2 ml of dichloromethane. Then, MCPBA (0.30mmol, 67.24mg) was added to this solution and the mixture was allowed to react under vigorous stirring and at room temperature. The reaction was controlled by Thin Layer Chromatography (TLC), using the eluent EA/PE 1:1. After 8h of reaction it remains a large amount of substrate to be consumed and a new amount of MCPBA was added (33.6mg), with little progress on the reaction after 1h. After 25h, a new amount of MCPBA was added (50.7mg), again with little consumption of the substrate, and this step was repeated after 2h (more 49.8mg of MCPBA). Solution was allowed to react more 24h, but due to the few progresses after these additions of the peroxiacid, the reaction was stopped and worked up, still with a considerable amount of substrate to react.

The solution was worked up by adding 50ml of diethyl ether to the reaction mixture and then, 20ml of saturated aqueous sodium bicarbonate solution was added. After this extraction the resulting organic layer was washed with 20ml of purified water, dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and allowed to evaporate in vacuum, affording a yellow solid. Then, the

resulting solid was subjected to column chromatography, with a gradient of PE/EA starting on 1:1 and finished with 1:2. The product was obtained as an yellow solid/crystals (36.3 mg) providing a provisional yield of 73.0%.

We submitted the compound to NMR testing (^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C DEPT 135, COSY, HSQC, HMBC, NOESY), however, some impurity was found and avoided us to perform a thorough and full analysis of the spectra. Discussion about this point is extended ahead.

1.4 Results and Discussion

1.4.1 Computational studies

1.4.1.1 Molecular Docking studies

Molecular Docking studies in order to search for new inhibitors of 17 β -HSD type 1, performed by our group, relied on estrone C2, C3, C6, C9, C11 and C12 functionalization and also on the transformation of a 5-membered D-ring presented by estrogens into their 6-membered lactonized D-ring homologues. We also performed a comparison between the later and the D-homoestrogen homologues reported by Moller *et. al*¹⁸. Besides its inhibitory capacity, one of the greatest objectives inherent to the design of new inhibitors for this enzyme, contextualized on the application for hormone-dependent breast cancer treatment, is the development of compounds lacking, or having low estrogenic activity, thus, avoiding the proliferation of the ER-positive cancer cells. This can be achieved with C2 substitutions, removal of 3OH moiety or functionalization of C6 as referred before.^{60,61}

Thus, the application of the docking procedure previously described, AutoDock Vina provided us affinity values and we calculated the average of the best four affinity values for each molecule. These are presented on **Tables 1.3 to 1.9** along with the highest affinity values. An overall analysis of these results evidenced that all estrone lactonized derivatives presented higher affinity values than their homologs with a D-ring with 5 members, confirming our hypothesis - such as the described D-Homo derivatives, the lactone ring also provided good results, that can in the future, be extrapolated to good inhibition profiles.

We will start our discussion with substitutions on C2 (**Table 1.3, 1.5 and 1.8**). These are promising compounds, as substitutions at C2, reported as small alkyl or O-alkyl, can diminish the estrogenic activity, and thus, the potential carcinogenicity of the estrogens^{12,57,61}. We observed that our proposed substitutions provided higher affinity results compared to non-substituted compounds, the halogens being the moieties presenting the best affinity results. In general, substitutions with higher electronic density and electron withdrawing properties originated compounds with better results, although no direct correlation in terms of polar contacts to any amino-acid was found. The explanation to this phenomenon is the fact that the environment surrounding the 2-location is hydrophobic, as described by Moller *et. al*¹⁸, fact that we further confirmed with the analysis with PyMol of the docked molecules: the amino-acids surrounding the projection of C-2 substitutions are lypophilic, composed by the amino-acids Met147, Leu262, Met279, Val143 and Phe259 (**Figure 1.23**).

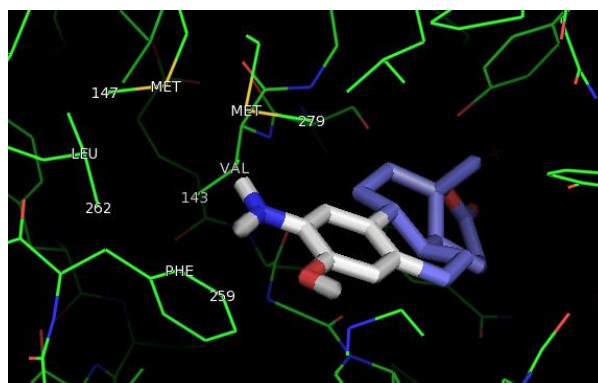
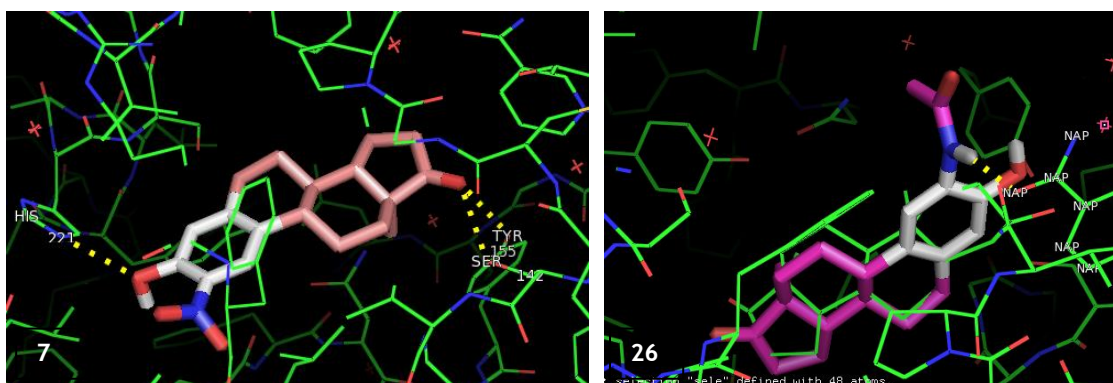


Figure 1.23 - Docked result for 17. Notice the hydrophobic environment surrounding C2 branch.

Analyzing the cLogP of C2 substituted compounds (Table 1.3), calculated with ChemDraw Ultra v12, we examined that the ones that presented higher cLogP values were the ones presenting also higher affinity values, although this correlation wasn't true between the halogens. The C2 substitution proposed by Moller *et. Al*¹⁸, presented in the estrone-derivative compound 48, was the one with the highest cLogP value, and highest affinity, remarking the importance of hydrophobic moieties in this place to achieve better affinity values.

A remarkable different was observed for compound 26 which show a polar interaction with NADPH in the best configuration mode, provided by the inversion of the configuration of steroidal skeleton. Short substitutions at C2 maintain the normal binding of the steroids at the referred binding pocket, as well as larger hydrophobic substitutions (compound, these showing polar interactions with the same amino-acids that interact with estrone: 3-OH interacting with Hys221 and 17-CO interacting with Ser142 and Tyr115 (Figure 1.24).



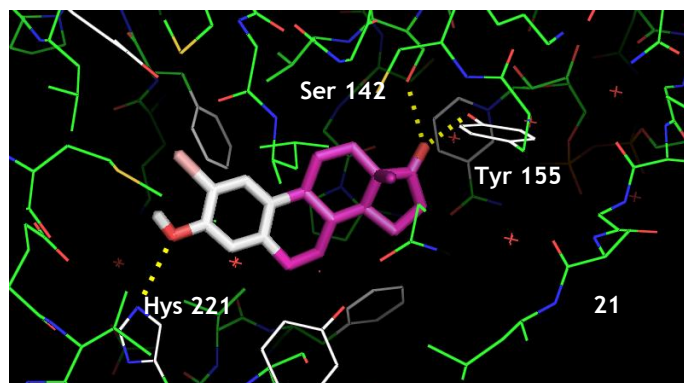


Figure 1.24 - Docked C2-substituted compounds **7**, **26** and **21** in the crystal PDB# 3KM0 by AutoDock Vina. Notice the position and the interactions between 3-OH and Hys221, and Tyr155 plus Ser142 with polar interactions with the oxygen in C17, near the cofactor NADPH, and the inversion of steroid skeleton in **26** due to the larger group at C2. This image was created with PyMol.

4-Substitutions, also obtained in the majority of chemical reactions for the achievement of 2-substituted estrogens, were also tested, but the affinity results weren't favorable, the highest affinity energies being below the -9.0 kcal/mol (data not shown).

For quinol A-ring derivatives (Compounds **6** and **16**, presented on **Table 1.7**), we verified that the results weren't the most favorable. The OH at C10 could not perform any polar contact to any amino-acid, which helps to explain these results. These were promising compounds, as the lack of aromaticity on ring A rendered them as molecules with low estrogenic activity⁶².

Tests with C6-functionalized estrone derivatives (**Table 1.3** and **1.5**) were performed given that some of these derivatives also have low estrogenic activity, and because there were described some good inhibition values regarding on some substitutions in this place^{19,34}. Our C-6 substituted compounds doesn't provided very high affinity values, being around -9.4 and -9.8kcal/mol. We also observed that β -substitutions (compound **27**) provided higher values than α -substitutions (compound **28**) - although both are able to interact with Tyr 218, Ser222 and Asn152, only β orientation is able to do that without inverting the steroid configuration, presenting besides these interactions, polar interactions between His221, Tyr155 and Ser 142, that are lacking in α -configuration (**Figure 1.25**). This evokes the importance of stereochemistry on this location.

Moreover we detected that C11 and C9 substitutions led to very similar polar interactions compared to C6 functionalized compounds (**Table 1.3**). The steroid nucleus turns itself in order that C11 substitutions interact with the amino-acids Tyr218, Ser222 and Asn152, independently if they are α or β functionalized. Due to this displacement, these compounds lack interactions with His221, Tyr155 and Ser142, leading to poor affinity values.

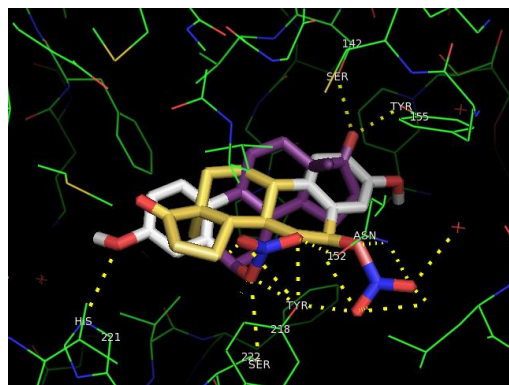


Figure 1.25 - Superimposal of docked results for C6 β **27** (purple) and C6 α **28** (golden). Image created on PyMol.

To perform the comparison between the D-homo compounds analogous to those reported by Moller *et.al.*¹⁶ and the lactonized D-ring compounds, we designed similar molecules, changing only the D-ring to afford one or other moiety, and ran the docking calculations (Table 1.5, 1.6 and 1.8). Both presented better affinity results than the 5-membered D-ring analogs. In general, the lactonized derivatives showed similar or even greater affinity than the D-Homo derivatives, which proves that in addition to a simpler synthesis, they can present more efficient enzyme inhibition, needing further investigation with inhibitory tests in order to confirm these predictions. Also, choosing the lactonized compounds goes toward the concept of Green Chemistry. However, we can find some special cases: a carbonyl moiety in C12 conjugated with a C9=C11 double bond in D-homo derivatives gave a compound with less affinity than the lactonized derivative and even than the 5-membered D-ring analogs (compound **44**, Table 1.8). By analyzing the docked results in PyMol for the homologues compounds **9**, **19** and **44** (Figure 1.26), one can identify the polar interactions involved on these interesting derivatives with a carbonyl moiety on C-12 (Table 1.4, 1.6 and 1.8): for the estrone derivative (**9**), the carbonyl at C12 can interact with Val143, Gly144, and Ser142, while carbonyl at C17 interacts with Ser142 and Tyr155. The lower affinity results presented by the lactonized ring analog (**19**) can be explained with the fact that the carbonyl at C12 doesn't interact with Val143. Also, the carbonyl at C17 lacks polar interactions. As for the D-Homo derivative (**44**), the carbonyl on C12 is unable to interact with Val143, Gly144, nor Ser142, thus, presenting the lowest affinity results for this series of compounds. It only presents interactions between the C17 carbonyl and Ser142 and Tyr155. This might be due to the higher proximity between the two carbonyl moieties on the D-homo derivative, which produces a greater repulsion on the rings, causing a torsion of the rings and the carbonyls not being planar to each other.

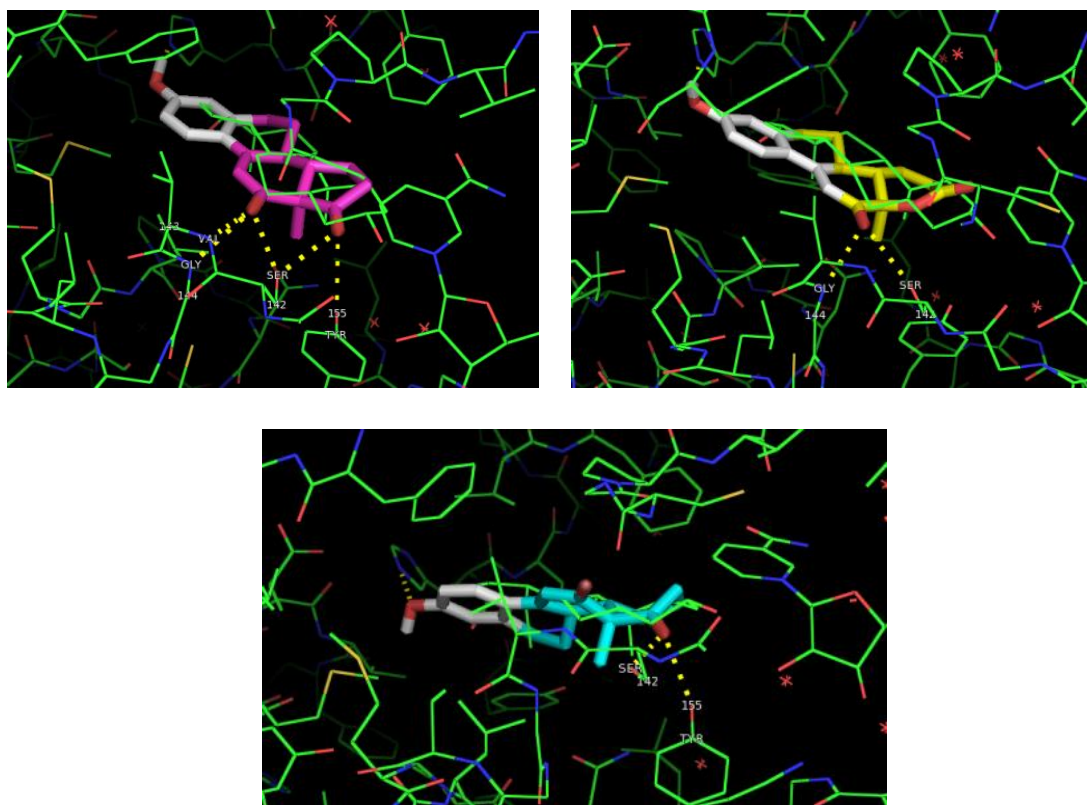


Figure 1.26 - Docked results for compounds **9** (magenta), **19** (yellow) and **44** (cyan). Notice the different types of interactions related to the importance of ring torsion. This image was created with PyMol.

Some interesting results relying on the 3-OH protected as its acetyl derivative are observed: all the compounds with the protected 3-OH group showed higher affinity results than the free 3-OH. It thus may be interesting to find or use equivalent moieties of the ester group, given that this group, due to its special location on the steroid ring, not suffering steric hindrance, may be easily attacked *in vivo* by esterases²⁴, which means that when the molecule reaches the active pocket of the enzyme, it will be bearing the free 3-OH group: then the affinity predicted will be the same as the predicted by the analogs with free 3-OH.

For this reason we proposed some groups substituting the ester moiety (examples in **Figure 1.27**), based on the hypothesis that an ester, presenting pairs of unshared electrons belonging to the carbonyl and oxygen, and thus presenting the capacity of being a hydrogen-bond acceptor, would be preferable for higher affinity values than an hydrogen-donor moiety such as hydroxyl. We then used some moieties able to work as H-bond acceptors, including heterocyclic rings, and led then through docking studies as well. Some results are presented in **Table 1.9**.

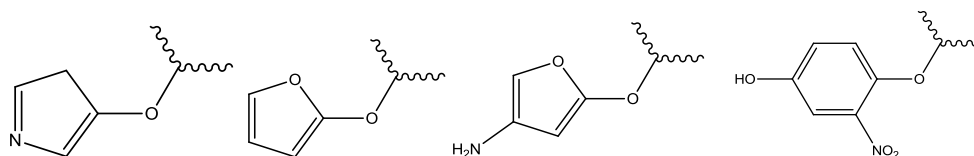


Figure 1.27 - Examples of moieties substituted on C3 proposed by our group.

Further, we analyzed the enzyme docked with these molecules in PyMol in order to find polar contacts with the enzyme whereby it was detected that Hys221 and Glu282 are involved in such interactions (**Figure 1.28**). We can then conclude that these residues, involved in interactions with 3-OH⁵, prefer H-bond acceptor moieties for interactions leading to better affinities. When we introduced larger alkyl groups containing a moiety like this (like NH₂, compound **60**) it happened, as presented by docking results, that the steroid reversed its configuration on the pocket (location of ring A superimposed on the place of ring D), interacting with the co-factor, such as for 16-substitutions⁵. The compounds presenting heterocyclic rings or aromatic ring substituted with H-bond acceptor groups presented excellent affinity results, above -10.1 kcal/mol. The same was not noticed for **60**, revealing the importance of maintaining the interactions with Hys221 and Glu282 for better affinity results. Compounds **59** and **58**, that combine the capacity of hydrogen bond receptor and donator (NH₂ and OH moieties) presented very good results. Further tests are needed in order to better analyze these results.

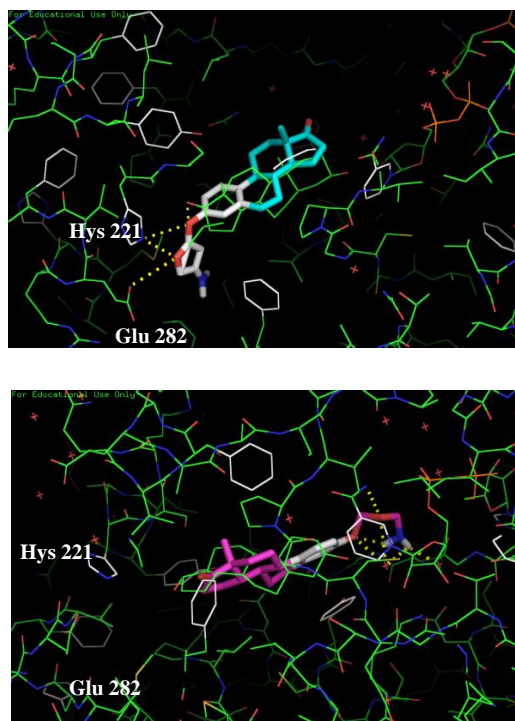


Figure 1.28 - Docking of the suggested compound **58** and **60**. Large alkyl-ether substitutions on C3, favors the interaction with NADPH, while shorter substitutions with hydrogen-acceptor groups like **58** favor the interaction on the opposite place of the pocket with Hys221 and Glu282. This image was created with PyMol.

After this analysis, we are able to resume the interactions from our functionalizations in the following scheme (Figure 1.29):

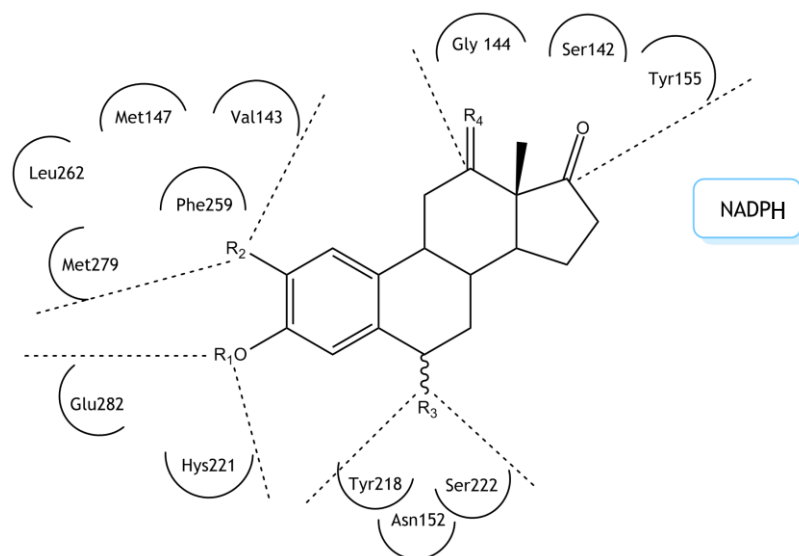


Figure 1.29 - Resume of interactions of estrogen substitutions with 17β-HSD binding pocket. Image created by ChemDraw v12. All represent polar interactions except for R₂ interactions, that are hydrophobic.

As future remarks on docking studies, our group proposes:

- Explore the best C2-C3 substitutions combinations in order to obtain better inhibitions results than the ones observed for only C2 or C3 itself;
- Find new moieties for C2 and/or C3 substitution.
- Explore lactonized D-ring estrone derivatives and the best C3 substituted compounds;
- Explore the combination of the lactonic ring with other successful substitutions such as in C15 or C16.

As global future remarks we expect to confront docking studies with inhibition assays using T-47D cells, in order to analyze correlations between the results and determine a more accurate SAR for C2 and C3 substitutions. Also, these compounds need to be assayed *in vitro* in order to define their estrogenicity and toxicological effects.

It will also be important to perform these docking calculations using crystals of other forms of 17β-HSDs, most importantly type 2 (which has the opposite action of type 1), 3β-HSD steroid sulfatase, aromatase, and other enzymes involved in steroidogenesis or in steroid metabolism or formation, in order to find or elucidate if their affinity are specific, or more selective to our enzyme of interest. Also, these conclusions may be confirmed by *in vitro* studies¹⁹.

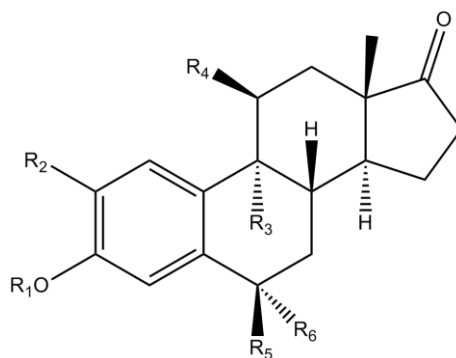
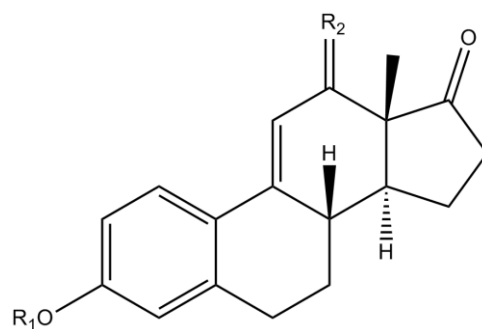


Table 1.3- Results obtained for estrone derivatives

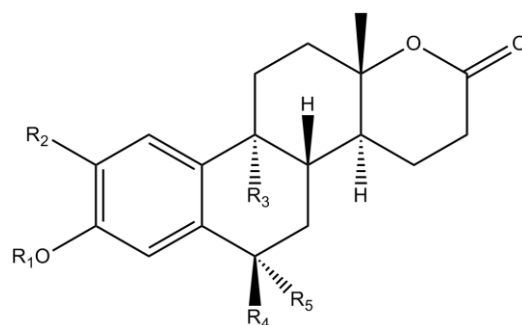
Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	clogP	Average affinity (kcal/mol) ^[a]	Higher affinity (kcal/mol)
Estrone	H	H	H	H	H	H		-9.1	-9.5
1	Ac	H	H	H	H	H		-8.8	-9.0
2	Ac	H	OH	H	H	H		-9.8	-10.1
4	H	H	OH	H	H	H		-9.3	-9.5
7	H	NO ₂	H	H	H	H	3.76	-9.5	-9.9
20	H	I	H	H	H	H	4.45	-9.4	-9.7
21	H	Br	H	H	H	H	4.26	-9.5	-10.0
22	H	Cl	H	H	H	H	4.06	-9.7	-10.2
23	H	F	H	H	H	H	3.62	-9.6	-9.9
24	H	COCH ₃	H	H	H	H	3.8	-9.5	-9.9
25	H	NH ₂	H	H	H	H	2.5	-9.2	-9.6
26	H	NHCOCH ₃	H	H	H	H	2.6	-9.5	-9.8
27	H	H	H	H	ONO ₂	H		-9.5	-9.7
28	H	H	H	H	H	ONO ₂		-9.1	-9.4
29	H	H	H	H	H	N ₃		-8.8	-9.4
30	H	H	H	H	N ₃	H		-9.0	-9.8
31	H	H	H	H	NHCOCH ₃	H		-9.0	-9.4
32	H	H	H	H	H	NHCOCH ₃		-8.9	-9.4
33	H	N ⁺ ≡N	H	H	H	H	3.07	-9.73	-10.3
34	H	OH	H	H	H	H	2.78	-9.2	-9.6
35	H	H	OH	ONO ₂	H	H		-9.7	-9.1
47	H	CN	H	H	H	H	3.5	-9.9	-10.4
48	H	(CH ₂) ₃ Ph	H	H	H	H	6.15	-9.8	-10.5
49	H	COH	H	H	H	H	1.8	-9.4	-9.9

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.

**Table 1.4** - Results obtained for estrone derivatives

Compound	R ₁	R ₂	Average affinity (kcal/mol) ^[a]	Higher affinity (kcal/mol)
3	Ac	H,H	-9.8	-10.1
5	H	H,H	-9.3	-9.7
8	Ac	O	-10.0	-11.0
9	H	O	-9.6	-10.8

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.

**Table 1.5** - Results obtained for estrone D-lactonized ring derivatives

Compound	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	Average affinity ^[a] (kcal/mol)	Higher affinity (kcal/mol)
10	Ac	H	H	H	H	-10.0	-10.5
11	Ac	H	OH	H	H	-10.1	-10.4
13	H	H	OH	H	H	-9.6	-9.8
15	H	H	H	H	H	-9.5	-9.6
17	H	NO ₂	H	H	H	-9.7	-10.0
37	H	H	H	O	-	-9.7	-10.2
38	H	NH ₂	H	H	H	-9.3	-9.6
39	H	I	H	H	H	-9.5	-9.8
40	H	CHO	H	H	H	-9.5	-9.9
42	H	NHCOCH ₃	H	H	H	-9.3	-9.9
53	H	CH ₂ CHCH ₂	H	H	H	-9.2	-9.7
54	H	(CH ₂) ₂ Ph	H	H	H	-9.9	-10.7

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.

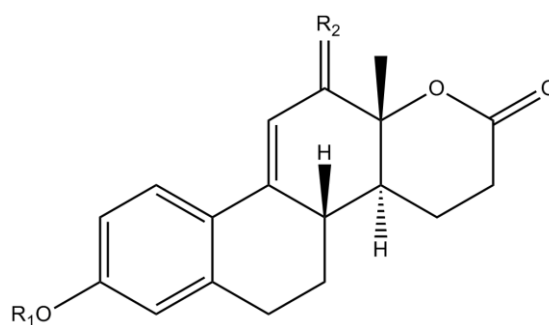
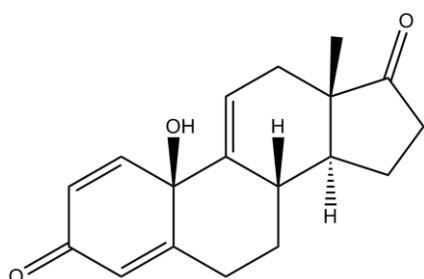


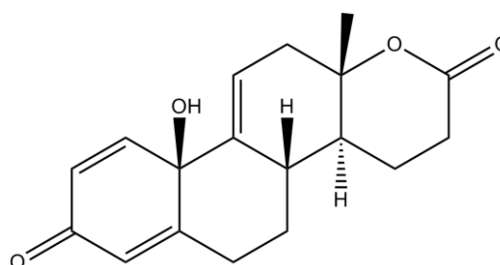
Table 1.6 - Results obtained for estrone D-lactonized ring derivatives

Compound	R ₁	R ₂	Average affinity (kcal/mol) ^[a]	Higher affinity (kcal/mol)
12	Ac	H,H	-10.1	-10.3
14	H	H,H	-9.5	-9.9
18	Ac	O	-9.8	-10.1
19	H	O	-9.5	-9.7

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.



6

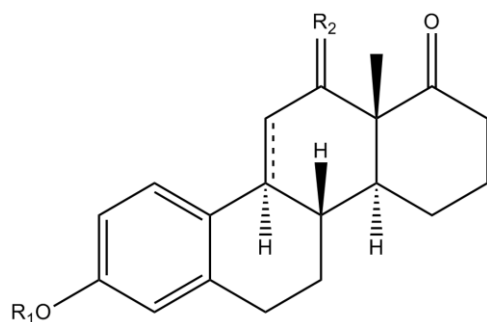


16

Table 1.7 - Results obtained for compounds **6** and **16**

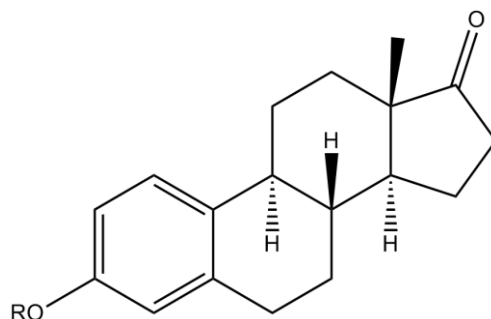
Compound	Average affinity (kcal/mol) ^[a]	Higher affinity (kcal/mol)
6	-8.9	-8.9
16	-8.9	-9.2

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.

**Table 1.8** - Results obtained for docking of some D-Homo derivatives

Compound	R ₁	R ₂	Double bond	Average affinity (kcal/mol) ^[a]	Higher affinity (kcal/mol)
43	H	H,H		-9.6	-9.6
44	H	O	Yes	-9.5	-9.6
45	NO ₂	H,H		-9.7	-9.9
46	H	H,H	Yes	-9.8	-10.0
50	I	H,H		-9.5	-10.0
51	(CH ₂) ₂ Ph	H,H		-10.0	-10.8
52	Cl	H,H		-9.95	-10.2
55	CH ₂ CHCH ₂	H,H		-9.2	-9.6
56	COH	H,H		-9.6	-9.8

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.

**Table 1.9** - Results obtained for estrone derivatives C3-substituted

Compound	R	Average affinity (kcal/mol) ^[a]	Higher affinity (kcal/mol)
57		-10.2	-10.6
58		-10.3	-10.5
59		-10.4	-10.7
60		-9.4	-9.7
61		-10.0	-10.1

[a] Affinity binding energies obtained with AutoDock Vina software. Average of the four best binding modes.

1.4.1.2 *In silico* toxicity studies

All the compounds were analyzed with the tools provided at The Organic Chemistry Portal with OSIRIS Property Explorer, for its toxicity results on mutagenesis, tumorigenesis, irritant and reproduction effects. In the program, results are presented in *drug conform* (green), *undesired effects* (red) and also an intermediate state (yellow) between those results. All compounds presented *drug conform* results for these parameters, except for the compounds on the following table (Table 1.10):

Compound	Mutagenic	Tumorigenic	Irritant	Effects on reproduction
2	N	N	N	Y
11	N	N	N	Y
35	N	N	N	Y

As it can be seen, all the molecules that presented an α -hydroxyl moiety at C9 can present undesired reproductive effects. All the other compounds were considered safe regarding on the parameters analyzed, and this support them as a potential new generation lead compounds, as some reference inhibitors compounds tested may present problems such mutagenicity.

Recently, Sara Silva (MsC Biochemistry student), who works in our group also in this project, has made toxicity studies using fibroblasts cells and achieved results that confirm our *in silico* toxicity studies. Also, the results have shown that the compounds presenting the lactonized D-ring present low toxicity on these cells that can be extrapolated to low toxicity on the organism.

1.4.2 Chemical Synthesis

Before deciding a synthetic strategy, we predicted the affinity values for this enzyme, by using the referred docking studies. These studies are frequently used to predict the bioactivity of the compounds, and thus, working as a filter, helping to economize material, reagents and time synthesizing compounds that were unlikely to have good activity. So, we tested several compounds, namely estrone derivatives: substitutions at C-2, C-3, C6, C9 and C-12 position, lactonized D-ring derivatives and other D-Homo derivatives, the later in order to investigate whether the lactonized D-rings are preferable to them - presented in Table 1.3 to 1.9.

Sara Silva has successfully synthesized compounds 1 to 19 (Table 1.3 to 1.7), and also compound 35, aiming mainly to compare the bioactivity of estrone derivatives with the

lactonized D-ring analogues in cell toxicity assays and in enzyme inhibitory activity assays in T-47D cells.

We then proposed the following synthetic pathway for our present work (Figure 1.30):

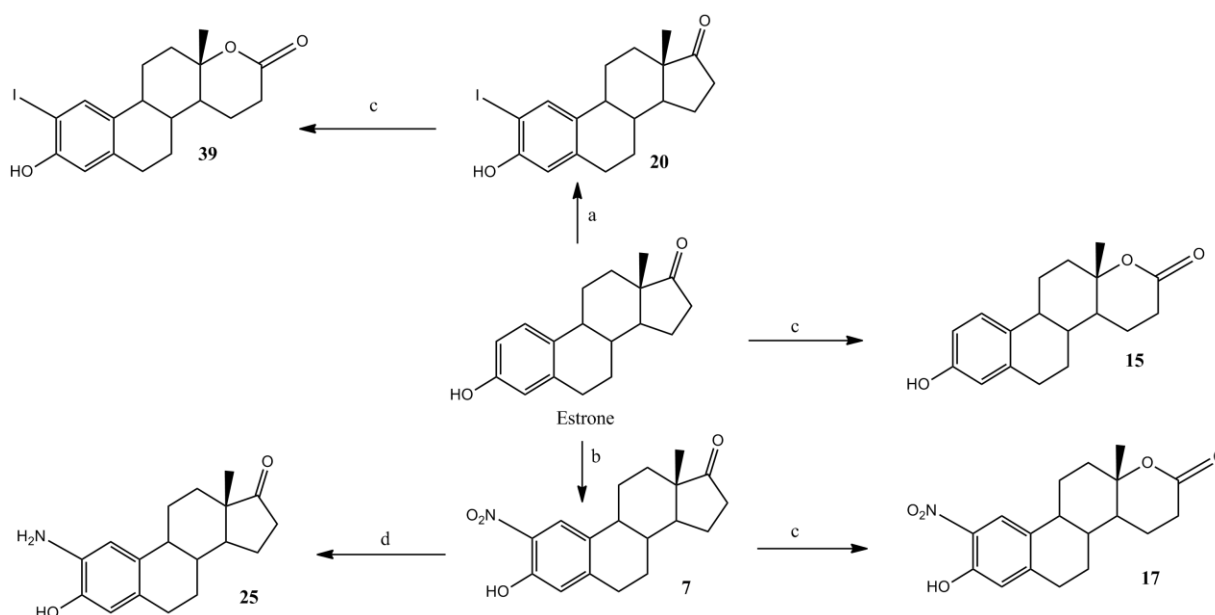


Figure 1.30 - Synthetic pathway proposed to our work. The starting material is Estrone. a) for 0.25mmol Estrone: NaI (0.5 eq), NaClO₂ (0.5eq), HCl 37% (62μl), methanol (12.5ml), H₂O 12,5ml); b) for 1mmol Estrone: HNO₃ (1.2eq), AcOH (8.4ml); c) for 0.25 mmol substrate: CH₂Cl₂ (2ml), MCPBA (2eq); d) for 0.15mmol of 7: Na₂S₂O₄ (14,47eq), acetone (14.2ml), H₂O (2.8ml), NaOH 1N (2.8ml)

This is a partial synthetic work, and is complementary to synthesis being performed by Sara Silva and was constructed with the main objective of further comparison of several simple 2-substituted estrone structures to their D-lactonized ring analogs in biological enzyme inhibition assays.

We attempted to synthesize some C2-functionalized estrone compounds and some lactonized D-ring estrone derivatives through Baeyer-Villiger reaction as the scheme illustrated before. Further reactions from the general scheme are yet to be performed, but we successfully synthesized and isolated 2-iodoestrone (**20**) and 2-nitroestrone (**7**).

The iodination reaction affording 2-iodoestrone was performed according to L.Lista *et. al.*⁵⁴. As described by the authors, the reaction was not complete, but was selective and afforded pure 2-iodoestrone, after column chromatography as a pale yellow solid, result confirmed by NMR ¹H and ¹³C spectra. This reaction is preferable to the other one tried by us and described by reference⁵⁶ because it is selective, and the non-reacted substrate can be isolated and re-used. Also, the procedure with CuCl₂.H₂O and iodide needs a non-oxidant atmosphere, while the first one can be done under oxygen atmosphere, and is more time-consuming and affords a mixture of 2 and 4-iodoestrone, that have very similar R_f, and therefore are difficult to isolate by column chromatography. However, the yields obtained by us, after column

chromatography, were much lower (13.4% and 13% in two reactions done) than the described by the authors (40%).

The nitration reaction was done in order to obtain 2-nitroestrone, as a modified version of the one described by G. Stubenrauch *et. Al*⁶³. Just as for the iodination reaction, an excess of the nitrating agent would promote the formation of the undesired 2,4-dinitroestrone. 4-nitroestrone was formed under any condition along with 2-nitroestrone⁵⁷. Because of that, the yields obtained for 2-nitroestrone were not the most advantageous, but were similar to the described by the authors (39%). In the first TLC studies, we weren't able to distinguish between 2-nitro and 4-nitroestrone by TLC - their R_f are very similar. In order to separate these compounds we had to use a very lipophilic eluent, as PE/EA 3:1, and in the chromatography column a fraction of 2-nitroestrone was lost because it was eluted along with 4-nitroestrone. Both are yellow crystals: the color should be due to the resonance between the aromatic ring with the nitro moiety. The most polar product isolated from column chromatography was, in fact, 2-nitroestrone, as confirmed by NMR ^1H and ^{13}C spectra.

There are several described Baeyer-Villiger reaction conditions, each one involving different reagents⁶⁴. Our attempt in Baeyer-Villiger reaction made use of 3-chloroperbenzoic acid (MCPBA). When substrate was estrone, although the reaction was not selective, as there were obtained two products with UV absorption, we could isolate them, expecting that it was not necessary to perform a previous protection of 3-OH group. However, the yields were low and, after RMN analysis of the products we concluded that we did not obtain the lactonic steroid. In fact, analysis of ^{13}C NMR spectrum showed a signal at 220ppm in both products, characteristic of the C17 carbonyl of the cyclopentane ring of steroids, which made us believe that conversion to lactone wasn't successful.

The Baeyer-Villiger reaction applied to 2-nitroestrone, although with low substrate conversion, seemed much more selective than with estrone as substrate, originating only one product. It was needed more quantity of MCPBA as compared with estrone as substrate. After column purification, the provisional yield was 73%, much higher than we expected and than the ones obtained with BV of estrone. However, we believe that such high yield may not belong only to the desired product, but to a mixture of it plus some non-neutralized peroxyacid (MCPBA) present in excess from the reaction. Signals of this probable contamination were therefore found on NMR spectra. Nevertheless we've found several signals that indicated us that we probably obtained the desired compound: first, the ^{13}C NMR 220ppm signal disappeared and a new signal at 171.27ppm appeared, suggesting that C17 carbonyl present in 2-nitroestrone converted into a carbonyl present in lactone. Also, a new signal of a quaternary carbon appeared around 82.9 ppm, probably from C13, which should be directly connected to the oxygen from the supposed lactone. Last, signal of CH_3 -18 significantly raised from 13.77 (found in 2-nitroestrone) to 20ppm, also maybe due to the lactone. The analysis of bidimensional spectra also confirmed us our hypothesis. Further

studies and experiment involving complete neutralization of MCPBA from the product in order to obtain the pure product are needed, in order to repeat all the analysis and provide a complete structural characterization of it.

The selective reduction of 2-nitroestrone to 2-aminoestrone (**25**) was also performed as described by Kraychy *et al.* and G. Stubenrauch *et.al.*^{63,65}. Indeed, through TLC during the reaction, we saw that conversion from **7** to **25** was total and very quick. However, during the extraction, the product was completely destroyed and converted into other products. This is possibly due to the excessive sensibility of the amine to oxidative environment, and further studies are needed in order to find the best conditions of working and storing this product (e.g.: working with nitrogen or argon atmosphere and using a different method of extraction - precipitating and filtering the product in a cold environment instead of performing an extraction with organic solvents and vacuum evaporation of the solvent with high temperatures).

1.5 Conclusions

Hormone-dependent breast cancer is one of the most common form of this cancer, relying especially on estradiol, originated by 17 β -HSD type 1, for their growth. For this reason, the inhibition of this enzyme can be a specific, directed and promising approach to stop its progression and further treatment.

The search for inhibitors for this enzyme was the main basis of our present work - in fact, several estrone derivatives with a lactonized D-ring proved, by the docking studies, to have more affinity to this enzyme than the 5-membered D-ring analogues, and equally or even better affinity than previously described homologue D-Homo derivatives. After chemical synthesis (which is also being performed), the 17 β -HSD-1 inhibition profile of these D-lactone estrone derivatives will be further evaluated *in vitro* inhibition assays with T-47D cells by our group.

Also, after these *in silico* toxicity results, *in vitro* fibroblast cytotoxicity is being evaluated by Sara Silva (Biochemistry MsC student) aiming to obtain compounds for a future human use.

In addition to good docking and toxicological results, these lactone derivatives have a probable simpler chemical synthesis than these D-Homo derivatives. In fact, they can probably be prepared mainly involving a Baeyer-Villiger reaction and aromatic electrophilic substitutions.

We then believe that these molecules can become lead and novel compounds for inhibition of 17 β -HSD-1.

As future remarks remain the development of new C3 substituted estrone derivatives and their lactonized D-ring homologues, and their evaluation by *in vitro* inhibitions assays. In fact, as docking studies previewed, these novel compounds seem to be potent enzyme inhibitors, showing high affinity values for its active pocket. Also, the confirmation of the docking results with *in vitro* assays will prove the accuracy and the remarkable importance of this tool in drug discovery.

1.6 Bibliography

- [1] Liga Portuguesa contra o Cancro; www.ligacontracancro.pt/ (accessed May 25, 2012)
- [2] Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Flower, R. J.; Henderson, G.; *Rang and Dale's Pharmacology*; Elsevier Churchill Livingstone, 6th edition, 2007, pp 718-733.
- [3] Pasqualini, J. R.; Chetrite, G. S.; Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2005**, *93*, 221-236.
- [4] Allan, G. M.; Bubert, C.; Vicker, N.; Smith, A.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J.; Potter, B. V. L.; Novel, potent inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2006**, *248*, 204-207
- [5] Schuster, D.; Kowalik, D.; Kirchmair, J.; Laggner, C.; Markta, P.; Aebischer-Gumyc, C.; Ströhleb, F.; Möller, G.; Wolber, G.; Wilckens, T.; Langere, T.; Odermatt, A.; Adamski, J.; Identification of chemically diverse, novel inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 and 5 by pharmacophore-based virtual screening; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2011**, *125*, 148-161
- [6] Hartmann, R. W. *et.al.*; New Insights into the SAR and Binding Modes of Bis(hydroxyphenyl)thiophenes and -benzenes: Influence of Additional Substituents on 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 β -HSD1) Inhibitory Activity and Selectivity; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2009**, *52*, 6724-6743.
- [7] Gunnarsson, C.; Hellqvist, E.; Stal O. and the Southeast Sweden Breast Cancer Group; 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases involved in local oestrogen synthesis have prognostic significance in breast cancer; *British Journal of Cancer*, **2005**, *92*, 547 - 552
- [8] Hong, Y.; Chen, S.; Aromatase, estronesulfatase, and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Structure-function studies and inhibitor development; *Molecular and Cellular Endocrinology*. **2010**, *340*, 120-126
- [9] Reed, M. J.; Purohit, A.; Woo, L. W. L.; Newman, S. P.; Potter, B. V. L.; Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation, and inhibition.; *Endocrinology Reviews*, **2005**, *26*, 171-202.
- [10] Luu-The, V.; Analysis and characteristics of multiple types of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2001**, *76*, 143-151.

- [11] Deluca, D.; Moller, G.; Rosinus, A.; Elger, W.; Hillisch, A.; Adamski, J.; Inhibitory effects of fluorine-substituted estrogens on the activity of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2006**, *248*, 218-224
- [12] Lawrence, H. R.; Vicker, N.; Allan, G. M.; Smith, A.; Mahon, M. F.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Reed, M. J. and Potter, B. V. L.; Novel and Potent 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 Inhibitors; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *48*, 2759-2762
- [13] Messingera, J.; Husena, B.; Koskimiesb, P.; Hirveläb, L.; Kallio, L.; Saarenketoc, P.; Tholea, H.; Estrone C15 derivatives—A new class of 17 β hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2009**, *301*, 216-224
- [14] Marchais-Oberwinklera, S.; Henna, C.; Mollerc, G.; Kleina, T.; Negria, M.; Ostera, A.; Spadarod, A.; Wertha, R.; Wetzela, M.; Xua, K.; Frotschera, M.; Hartmann R. W.; Adamskic, J.; 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 β -HSDs) as therapeutic targets: Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2011**, *125*, 66-82
- [15] Vihko, P.; Isomaa, V.; Ghosh, D.; Structure and function of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2011**, *171*, 71-76
- [16] Suzuki, T.; Moriya, T.; Ariga, N.; Kaneko, C.; Kanazawa, M. and Sasano, H.; 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters; *British Journal of Cancer*, **2000**, *82*(3), 518-523
- [17] Poirier, D.; Contribution to the development of inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 7: Key tools for studying and treating estrogen-dependent diseases; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2011**, *125*, 83-94
- [18] Moller, G.; Deluca, D.; Gege, C.; Rosinus, A.; Kowalik, D.; Peters, O.; Driescher, P.; Elger, W.; Adamski, J.; Hillisch, A.; Structure-based design, synthesis and in vitro characterization of potent 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors based on 2-substitutions of estrone and D-homo-estrone; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, *19*, 6740-6744
- [19] Schuster, D.; Nashev, L. G.; Kirchmair, J.; Laggner, C.; Wolber, G.; Langer, T. and Odermatt, A.; Discovery of Nonsteroidal 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 Inhibitors by Pharmacophore-Based Screening of Virtual Compound Libraries; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2008**, *51*, 4188-4199

- [20] National Cancer Institute, www.cancer.gov (accessed May 25, 2012)
- [21] Erwin von Angerer; *The Estrogen Receptor as a Target on Rational drug Design*; Springer: New-York, 1995, p.49
- [22] Penning, T.M.; Bennett, M.J.; Smith-Hoog, S.; Schlegel, B.P.; Jez, J.M.; Lewis, M. Structure and function of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *Steroids*, **1997**, *62*, 101-111
- [23] Dufort; Rheault, P.; Huang, X.-F.; Soucy, P.; Luu; The, V. Characteristics of a highly labile human type 5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *Endocrinology*, **1999**, *140*, 568-574.
- [24] Starcevic, S.; Turka, S.; Brusa, B.; Cesara, J.; Riznerb, T. L.; Gobeca, S.; Discovery of highly potent, nonsteroidal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors by virtual high-throughput screening; *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, **2011**, *127*, 255-261
- [25] Day, J. M.; Tutill, H.; Purohit, A.; Reed, M.; Design and validation of specific inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis; *Endocrine-Related Cancer*, **2008**, *15*, 665-692
- [26] Broi, P.; Riner, T. L. and Broi, S. G.; Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1; *Current Medicinal Chemistry*, **2008**, *15*, 137-150
- [27] Alho-Richmond, S.; Lilienkamp, A.; Active site analysis of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 enzyme complexes with SPROUT; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2006**, *248*, 208-213
- [28] Karkola, S.; Alho-Richmond, S.; Wahala, K.; Pharmacophore modelling of 17 β -HSD1 enzyme based on active inhibitors and enzyme structure; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2009**, *301*, 225-228
- [29] Negri, M.; Recanatini, M.; Hartmann, R. W.; Insights in 17 β -HSD1 Enzyme Kinetics and Ligand Binding by Dynamic Motion Investigation; [Online] **2010**; PLoS ONE 5(8): e12026. doi:10.1371/journal.pone.0012026
- [30] Breton, R.; Housset, D.; Mazza, C.; Fontecilla-Camps, J-C.; The structure of a complex of human 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase with estradiol and NADPC identifies two principal targets for the design of inhibitors; *Structure*, **1996**, *4*, 905-915.
- [31] Klein, T.; Henn, C.; Negri, M.; Frotscher, M.; Structural Basis for Species Specific Inhibition of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1 (17 β -HSD-1): Computational

- Study and Biological Validation; [Online] PLoS ONE 6(8): e22990 doi: 10.1371/journal.pone.0022990
- [32] Messingera, J.; Husena, B.; Koskimies, P.; Hirveläb, L.; Kallio, L.; Saarenketo, P.; Thole, H.; Estrone C15 derivatives—A new class of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitors; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2009**, *301*, 216-224
- [33] Poirier, D.; Chang, H.; Azzi, A.; Boivin, R. P.; Lin, S.; Estrone and estradiol C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase; *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2006**, *248*, 236-238
- [34] Allan, G. M.; Lawrence, H. R.; Cornet, J.; Bubert, C.; Fischer, D. S.; Vicker, N.; Smith, A.; Tutill, H. J.; Purohit, A.; Day, J. M.; Mahon, M. F.; Reed, M. J. and Potter, B. V. L.; Modification of Estrone at the 6, 16, and 17 Positions: Novel Potent Inhibitors of 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 1; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, *49*, 1325-1345
- [35] AutoDock Vina official website, <http://vina.scripps.edu/> (accessed June 12, 2012)
- [36] Santaniello, E.; Ravasi, M. and Ferraboschi, P.; A-Ring Nitration of Estrone; *Journal of Organic Chemistry*, **1983**, *48*, 739-740
- [37] Keller and Weiss; Chemical Actions of Ionising Radiations in Solution. Part IX - Radiation Chemistry of Sterols. The Action of X-Rays on (+) - Estrone in Aqueous Solution; *Journal of Biological Chemistry*, **1947**, *171*, 61-81
- [38] Alvarez J. and Shoichet, B.; *Virtual screening in Drug Discovery*; Taylor & Francis, 2005, pp 3-19, 33-58, 127-132, 257, 279-297, 304-324.
- [39] Puzyn, T.; Leszczynski, J.; Croni, M. T.; *Recent Advances in QSAR Studies: Methods and Applications*; Springer, 1st Edition, 2010
- [40] Gardiner, E. J.; Willett, P.; Artymiuk, P. J.; Protein Docking Using a Genetic Algorithm; *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics*, **2011**, *44*, 44-56
- [41] Valerio Jr., L. G.; *In silico toxicology for the pharmaceutical sciences*; *Toxicology and Applied Pharmacology*, **2009**, *241*, 356-370
- [42] Stroud, R. M.; Moore, J.; *Computational and Structural Approaches to Drug Discovery*; RCS publishing; The Royal Society of Chemistry; 2008.
- [43] Krogsgaard-larsen, P.; Liljefors, T. and Maden, U.; *Textbook of Drug Design and discovery*; 3rd edition, Taylor and Francis, 2002.

- [44] Mannhold, R.; Kubinyi, H.; Folkers, G.; *Methods and Principles in Medicinal Chemistry, Volume 23 - Chemoinformatics in Drug Discovery*; Willey-VCH; 1st Edition, 2005
- [45] The Brookhaven Protein Data Bank website; <http://www.rcsb.org> (accessed June 20, 2011)
- [46] Stutzle, T.; *Iterated Local Search - Variable Neighborhood Search*; Darmstadt University of Technology.
- [47] The AutoDock official website; <http://autodock.scripps.edu/> (accessed June 17, 2012)
- [48] Trott, O.; Olson, A.J.; AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading; *Journal of Computational Chemistry*, **2010**, *31*(2), 455-461
- [49] Ghosh, S.; Matsuoka, Y.; Asai, Y.; Hsin, K. Y. and Kitano, H.; Software for systems biology: from tools to integrated platforms; *Nature Reviews - Genetics*, **2011**, *12*
- [50] Norris, R.; Casey, F.; FitzGerald, R. J.; Shields, D.; Mooney, C.; Predictive modelling of angiotensin converting enzyme inhibitory dipeptides; *Food Chemistry*, **2012**, *133*, 1349-1354
- [51] Friesner, R.A.; Banks, J.L.; Murphy, R.B.; Halgren, T.A.; Klicic, J.J.; Mainz, D.T.; Repasky, M.P.; Knoll, E.H.; Shelley, M.; Perry, J.K.; Shaw, D.E.; Francis, P.; Shenkin, P.S.; Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2004**, *47*(7), 1739-49
- [52] Thomsen, R. and Christensen, M. H.; MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2006**, *49*, 3315-3321.
- [53] Akhtar, S.; Al-Sagair, O. A. and Arif, J. M.; Novel Aglycones of Steroidal Glycoalkaloids as Potent Tyroine Kinase Inhibitors: Role in VEGF and EGF Receptors Targeted Angiogenesis; *Letters in Drug Design & Discovery*, **2011**, *8*, 205-215.
- [54] Lista, L.; Pezzella, A.; Napolitano, A.; d'Ischia, M.; Mild and efficient iodination of aromatic and heterocyclic compounds with the NaClO₂/NaI/HCl system; *Tetrahedron*, **2008**, *64*, 234-239.
- [55] Leese, M. P.; Hejaz, H. A. M.; Mahon, M. F.; Newman, S. P.; Purohit, A.; Reed, M. J. and Potter, B. V. L.; A-Ring-Substituted Estrogen-3-O-sulfamates: Potent

- Multitargeted Anticancer Agents; *Journal of Medicinal Chemistry*, **2005**, *48*, 5243-5256
- [56] Cushman, M.; He, H.; Katzenellenbogen, J. A.; Lin, C. M. and Hamel, E.; Synthesis, Antitubulin and Antimitotic Activity, and Cytotoxicity of Analogs of 2-Methoxyestradiol, an Endogenous Mammalian Metabolite of Estradiol That Inhibits Tubulin Polymerization by Binding to the Colchicine Binding Site; *Journal of Medicinal Chemistry*, **1995**, *38*, 2041-2049
- [57] Page, P. C. B.; Hussain, F.; Maggs, J. L.; Morgana, P.; Park, B. K.; Efficient Regioselective A-ring functionalization of oestrogens; *Tetrahedron*, **1990**, *46*(6), 2059-2068
- [58] Bose, A.; Sanjoto, W. P.; Villarreal, S.; Aguilar, H. and Banik, B. K.; Novel nitration of estrone by metal nitrates; *Tetrahedron Letters*, **2007**, *48*, 3945-3947
- [59] Wahba, A. E. and Hamann, M. T.; Reductive N-Alkylation of Nitroarenes: A Green Approach for the N-Alkylation of Natural Products; *Journal of Organic Chemistry*, **2012**, *77*, 4578-4585
- [60] Konyves, I.; Ollson; A.; Some nitrated derivatives of estriol; *Acta Chemica Scandinavica*, **1964**, *18*, 483-487.
- [61] Laplante, Y.; Cadot, C.; Fournier, M. A. and Poirier, D.; Estradiol and estrone C-16 derivatives as inhibitors of type 1 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase: Blocking of ER+ breast cancer cell proliferation induced by estrone; *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**, *16*, 1849-1860
- [62] Prokai, L.; Prokai-Tatrai, K.; Perjesi, P.; Zharikova, A. D.; Perez, E. J.; Liu, R. and Simpkins, J. W.; Quinol-based cyclic antioxidant mechanism in estrogen neuroprotection; *PNAS*, **2003**, *100* (20), 11741-11746
- [63] Stubenrauch, G. and Knuppen, R.; Convenient large scale preparation of catechol estrogens; *Steroids*, **1976**, *28*(5)
- [64] Brink, G. J.; Arends, I. W. C. E. and Sheldon R. A.; The Baeyer-Villiger Reaction: New Developments toward Greener Procedures; *Chemical Reviews*, **2004**, *104* (9), 4105-4124
- [65] Kraychy, S.; Gallagher, T.; 2-methoxyestrone, a new metabolite of estradiol 17 β in man; *Journal of Biological Chemistry*, **1957**, 519-26.

Capítulo II - Relatório de estágio em Farmácia Comunitária - Farmácia Sant'Ana

2.1 Introdução

As farmácias comunitárias são unidades enquadradas no sistema nacional de prestação de cuidados de saúde, com direcção técnica permanente de farmacêutico¹. Facilmente acessíveis a qualquer pessoa, existindo uma farmácia para cerca de cada 3.700 utentes dadas as suas numerosas e estratégicas localizações, tornam-nas um local privilegiado para o objectivo de prestação e promoção de cuidados de saúde, disponíveis para tal serviço 24horas por dia durante todo o ano¹.

Considerado o especialista do medicamento, o farmacêutico tem um importante e activo papel no dia-a-dia da farmácia comunitária, onde despontam constantemente desafios e problemas que necessitam ser resolvidos, seja em relação à medicação prescrita pelo médico, na situação de automedicação, entre outros.

A farmácia comunitária é um local de constante evolução e mudança - com o desenrolar do desenvolvimento investigacional na área da farmacologia e tecnologia farmacêutica, recentemente surgem novos princípios activos bem como novas formas farmacêuticas de diversas utilidades, que requerem e exigem uma aprendizagem constante por parte dos profissionais de saúde presentes na farmácia, de modo a se prestar um aconselhamento devido e rigoroso aos utentes que a ela se dirigem.

Não é apenas nos conhecimentos científicos que o farmacêutico se actualiza no decorrer do seu percurso na farmácia comunitária: regida por uma legislação estrita e em constante actualização, é sua função primordial estar atento a novas leis e decretos que sejam disponibilizados, de modo a se prestar um serviço legal e correcto por lei na farmácia comunitária, bem como um serviço de qualidade de excelência.

O estágio realizado em farmácia comunitária no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas encontra-se resumido nas páginas que se seguem doravante, onde se falará de cada secção de trabalho e cuidados de saúde realizados e prestados neste local de saúde.

2.2 Organização da farmácia Sant'Ana

2.2.1 Localização da Farmácia

A farmácia encontra-se localizada na freguesia da Covilhã - Boidobra, inserida no centro comercial Covilhã Shopping, em frente ao Centro Hospitalar da Cova da Beira.

O horário de funcionamento é das 9h - 22h sem interrupção para almoço, todos os dias, incluindo fins-de-semana, dias festivos e feriados.

Tal torna-a privilegiada na prestação de serviços aos utentes, dado a sua proximidade em relação ao hospital, onde os utentes podem aviar rapidamente as suas receitas, e horário de trabalho alargado relativamente às outras farmácias da cidade.

2.2.2 Recursos Humanos

São, indubitavelmente, as peças chave na fidelização em torno do atendimento ao utente - este identifica os recursos humanos da farmácia como peça central e motivo principal da sua ida à mesma, mais relevante que a própria localização ou horário de funcionamento. O utente estabelece um laço com o funcionário baseado na simpatia, amabilidade e profissionalidade do mesmo. Os recursos humanos são a arma mais poderosa na recruta de utentes à farmácia.

Os recursos humanos da farmácia Sant'Ana revelam respeitáveis qualidades no atendimento aos utentes, que revelam apreciá-lo, e são constituídos por:

Técnico Auxiliar de Farmácia - Ana Cláudia

Técnico Auxiliar de Farmácia Grau III - Rute Valentim

Técnico de Farmácia Grau III - Tiago Matas

Farmacêutico de Grau III - Dr. João Silva

Farmacêutico de Grau II - Dra. Ana Palmeira

Farmacêutico de Grau I - Dra. Alexandra Abreu (Farmacêutica Substituta)

Diretora técnica - Dra. Paula Bártolo

Outros recursos humanos que não se encontram dedicados ao atendimento ao utente:

Contabilista - Dr. António Abrantes

Empresa responsável pela limpeza

2.2.3 Funções do Diretor Técnico, seus substitutos e adjuntos

Segundo a legislação em vigor, compete ao diretor técnico, no exercício da sua atividade, assumir a responsabilidade pela execução de todos os atos farmacêuticos praticados na farmácia, cumprindo e fazendo cumprir as regras referentes ao exercício da atividade farmacêutica, nomeadamente:

- a) Verificar as condições de dispensa de medicamentos que exijam receita médica;
- b) Manter atualizados os suportes do receituário, especialmente o de estupefacientes;
- c) Elaborar o mapa trimestral de estupefacientes e promover o seu envio ao INFARMED;
- d) Assinar todas as requisições de medicamentos dirigidas aos fornecedores, tendo em atenção a utilização dos nomes genéricos e a prevenção de ruturas de abastecimento de medicamentos essenciais
- e) Adotar a classificação fármaco-terapêutico na arrumação dos medicamentos;
- f) Supervisionar periodicamente os prazos de validade dos produtos existentes na farmácia;
- g) Proceder à formação permanente do pessoal de farmácia, no que respeita à informação a prestar ao público e quanto ao modo de utilização dos medicamentos;
- h) Respeitar e fazer respeitar os regulamentos referentes ao exercício da profissão farmacêutica;
- i) Prestar ao público esclarecimentos quanto ao modo de utilização dos medicamentos, nomeadamente tratando-se de tóxicos perigosos;
- j) Manter os medicamentos e substâncias medicamentosas em bom estado de conservação, de modo a serem fornecidos nas devidas condições de pureza e eficiência;
- k) Promover que na farmácia sejam observadas boas condições de higiene e segurança
- l) Prestar a sua colaboração às entidades oficiais
- m) Promover as medidas destinadas a manter um aprovisionamento suficiente de medicamentos
- n) Exercer especial controlo sobre o fornecimento de estupefacientes, devendo alertar o médico prescritor e a Inspeção Geral de Saúde sobre quaisquer anomalias.⁵

Compete aos farmacêuticos a função de preparar, conservar e distribuir medicamentos ao público, de acordo com o regime próprio das farmácias, dos laboratórios de produtos farmacêuticos, dos armazéns destinados aos mesmos produtos, dos serviços especializados do Estado e dos serviços farmacêuticos hospitalares. Compete também ao farmacêutico a realização de determinações analíticas em medicamentos, com o fim da sua verificação, e de análises químico-biológicas, nos termos estabelecidos por lei.⁵

2.2.4 Espaço físico da farmácia

A atmosfera da Farmácia é profissional e calma, criando um ambiente que permite uma boa comunicação com os utentes. O Decreto-lei 307/2007, de 31 de Agosto refere-se às instalações da Farmácia de Oficina, estando a sua área mínima e a das respetivas divisões regulamentada pela Deliberação nº 2473/2007, de 28 de Novembro de 2007.

A farmácia Sant'Ana dispõe das seguintes divisões interiores:

1. *Área de atendimento ao público*

Este local é constituído pela sala de espera, com condições adequadas de climatização e luminosidade, com local para as pessoas em espera se sentarem, e dispõe de três balcões de atendimento devidamente informatizados. À vista dos utentes encontram-se os armários com os medicamentos de venda não sujeita a receita médica devidamente dispostos consoante categorias. O utente é livre de ver e escolher produtos para venda que se encontrem na sala de espera, ou pode aguardar por ajuda do funcionário.

2. *Área de receção de encomendas*

Esta área encontra-se equipada com o armário principal de armazenamento dos produtos medicamentosos (descrição detalhada mais à frente), um frigorífico, e um computador cuja função principal é a gestão e receção de encomendas e produtos. Ligado ao computador existe um aparelho de leitura ótica e uma impressora convencional e de códigos de barras. Este terminal é utilizado para o envio de pedidos de encomendas, para a receção e para as devoluções de encomendas e também, quando se encontra disponível, para o esclarecimento de dúvidas, consulta de *stocks* entre outras atividades. É também o local onde se realiza contacto com os armazenistas e laboratórios via telefone e onde se receciona informação via *fax*.

3. *Armazém*

Localizado no piso superior da farmácia, é onde se armazenam temporariamente todos os produtos que não conseguem ser organizados nos devidos locais por inexistência de espaço. Encontram-se organizados pela mesma lógica da sua organização nos locais principais: por ordem alfabética e prazo de validade, e por localização na farmácia.

4. *Escritórios*

5. *Gabinete de atendimento personalizado ao doente*

É um local de medição de vários parâmetros: glicémica, colesterol, entre outros. Neste local também são realizadas consultas de nutrição. São adequadas as condições de privacidade e conforto ao utente.

6. *Laboratório*

É composto por balcões, um lavatório, um exaustor e armários. Nestes encontram-se as matérias-primas utilizadas na preparação de manipulados, material para a embalagem e

rotulagem, material para a manipulação em laboratório e outros produtos como vários, necessários para a elaboração de manipulados. O material de laboratório consiste numa balança de precisão sensível ao miligrama, almofarizes de vidro e porcelana, diferentes espátulas, uma pedra de preparação de pomadas e cremes e o restante material definido por Lei necessário à preparação de manipulados. Em acesso facilitado encontra-se uma bancada com água purificada engarrafada, já que quase diariamente é necessário reconstituir preparações extemporâneas de diversos xaropes, especialmente antibióticos.

É também no laboratório que se encontram as documentações científicas, descritas mais adiante.

7. Vestiário

Local onde são deixados certos adereços vestiários e é colocada a bata de trabalho.

8. Instalações sanitárias

Essencialmente para uso do pessoal da Farmácia. Também pode ser utilizada pelos utentes para recolhas de urina para os testes de gravidez, ou outros motivos plausíveis.

2.2.5 Elementos interiores e exteriores distintivos da farmácia

2.2.5.1 Elementos interiores distintivos da Farmácia

São eles a identificação da propriedade e direção técnica (como consta no certificado de registo do INFARMED, e presente tanto no interior como no exterior), horário de funcionamento e identificação das farmácias de serviço.

2.2.5.2 Elementos exteriores distintivos da Farmácia

Os elementos exteriores distintivos da farmácia são a cruz verde luminosa (encontra-se acendida quando a farmácia se encontra aberta ao público), identificação da direção técnica e a própria designação de "Farmácia". A farmácia Sant'Ana, como pertence ao programa *Farmácias Portuguesas*, possui portanto a identificação da sua fidelidade apresentada por meio de uma faixa identificativa.

2.2.6 Equipamentos gerais e específicos da Farmácia

Equipamentos gerais: ar condicionado, sistema informático, telefone, *fax*.

Equipamentos específicos: *software* SIFARMA 2000, balança de laboratório, esfigmomanómetro, aparelho de análise de colesterol, triglicéridos e LDL, aparelho de medição da glicemia, banho termostatizado, aparelho geral para medição da tensão arterial e pulsação, altura e peso.

2.2.7 Equipamento informático

De extrema importância no desempenho e prestação de serviços da farmácia, esta necessita estar dotada de equipamentos informáticos atualizados e úteis. Em termos de *software*, a farmácia Sant'Ana encontra-se equipada com o mais recente *software* SIFARMA 2000, HW4 para controlo de temperatura e humidade e *software* de gravação de imagens pelas câmaras de segurança. O sistema operativo em todos os computadores é o Windows 7, e o *software* de criação e gestão de documentos é o OpenOffice. O SIFARMA 2000 encontra-se em constante atualização, seja respeitante à informação presente no seu dicionário de produtos, como preços (PMAs), entre outros.

2.2.8 Gestão de Qualidade

A farmácia encontra-se regida por manuais de qualidade, existindo procedimentos de qualidade realizados para funções relacionadas com o laboratório. Encontram-se, no momento em que estagiei, a ser realizados procedimentos de boas práticas e qualidade na dispensa, picada accidental e recepção de encomendas, de modo a serem posteriormente implementados. De momento a farmácia Sant'Ana não se encontra certificada por nenhum sistema de qualidade, sendo este um objectivo futuro a ser planeado e cumprido.

2.3 Informação e Documentação Científica

É inequívoca a importância da manutenção de uma informação atual acerca dos diversos e inúmeros produtos que chegam às portas da farmácia, tal é o crescimento na área das Ciências da Saúde. A manutenção de fontes de informação atualizadas, seja a nível manual ou em suporte informático, é crucial para a informação do farmacêutico, cuja formação base é por vezes insuficiente, para que possa aconselhar e esclarecer adequadamente o utente que se dirija à farmácia, mantendo assim o bom exercício da atividade farmacêutica.

A *Farmácia Sant'Ana* possui na sua biblioteca diversas fontes de informação algumas delas de presença obrigatória, como sejam:

- Farmacopeia Portuguesa (edição mais recente) e respectivos anexos;
- Prontuário Terapêutico.

Existem ainda outras fontes de informação de grande importância na farmácia, como sejam: Regimento Geral de Preços e Manipulações; Código de Ética da Ordem dos Farmacêuticos; Estatutos da Ordem dos Farmacêuticos, Formulário Galénico Nacional, Índice Nacional Terapêutico, Simposium Terapêutico, dicionário de termos médicos, acordos e legislação farmacêutica. Também são recebidas algumas publicações periódicas na farmácia. O próprio *software* SIFARMA 2000, revela-se uma fonte atualizada e bastante completa na informação científica disponível acerca dos produtos, para além de ser de fácil acesso. Com as novas tecnologias e o crescimento exponencial da Internet, aparecem com enorme frequência bases de dados e *sites* ligados ao mundo farmacêutico e através dos quais podemos obter muita informação útil para a prática diária, sendo uma ferramenta imprescindível para uma correta atualização.

Alguns dos sites úteis são:

- www.farmacia.com.pt
- www.anf.pt
- www.ordemfarmaceuticos.pt
- www.infarmed.pt

Existem também algumas estruturas de apoio: o Centro de Informação de Medicamentos (CIM) e o Centro de Informação sobre Medicamentos (CEDIME) pertencente à ANF (Associação Nacional de Farmácias).

2.4 Medicamentos e outros produtos de saúde

2.4.1 Definições

Medicamento: toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas⁸.

Substância psicotrópica: é a substância química que age principalmente no sistema nervoso central, onde altera a função cerebral e temporariamente muda a percepção, o humor, o comportamento e a consciência.

Estupefaciente: qualquer substância que atue no sistema nervoso, que tenha capacidade de provocar analgesia, sono ou inconsciência e cujo uso prolongado provoque dependência.

Medicamento genérico:

Definições

- **Medicamentos essencialmente similares:** todos os medicamentos com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, sob a mesma forma farmacêutica e para os quais, sempre que necessário, foi demonstrada bioequivalência com o medicamento de referência, com base em estudos de biodisponibilidade apropriados⁸;
- **Medicamento de referência:** é o medicamento cuja substância activa foi autorizada e comercializada pela primeira vez com base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios químicos, biológicos, farmacêuticos, farmacológicos, toxicológicos e clínicos⁸.
- **Nome genérico:** designação pela qual a substância activa de um medicamento é conhecida, que não corresponde a uma DCI aprovada ou recomendada e não é objecto de registo de marca ou de nome.

São considerados medicamentos genéricos, aqueles que reúnam cumulativamente as seguintes condições:

- Serem essencialmente similares de um medicamento de referência
- Terem caducado os direitos de propriedade industrial relativos às respectivas substâncias ativas ou processo de fabrico;
- Não se invocarem a seu favor indicações terapêuticas diferentes relativamente ao medicamento de referência já autorizado;

Preparado oficial: qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais de uma farmacopeia ou de um formulário oficial, numa farmácia de oficina ou em serviços

farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado directamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço.⁸

Fórmula magistral: qualquer medicamento preparado numa farmácia de oficina ou serviço farmacêutico hospitalar, segundo uma receita médica e destinado a um doente determinado.⁸

2.4.2 Gamas de produtos de saúde disponíveis na farmácia

- a) Os medicamentos em geral: formas farmacêuticas e classificação farmacoterapêutica.
- b) Medicamentos genéricos.
- c) Psicotrópicos e estupefacientes.
- d) Preparações oficinais e magistrais.
- e) Medicamentos e produtos farmacêuticos homeopáticos.
- f) Produtos fitoterapêuticos.
- g) Produtos para alimentação especial e dietéticos.
- h) Produtos cosméticos e dermo-farmacêuticos
 - a. Produtos capilares
 - b. Produtos de higiene corporal
 - c. Cuidados específicos para bebés
 - d. Produtos dermatológicos
 - e. Produtos para cuidado específico da mulher grávida
 - f. Dermocosmética de marcas específicas, gamas de cuidados gerais (Vichy, Uriage, Avene, etc.)
 - g. Produtos solares
 - h. Cuidados do pé
 - i. Cuidados das mãos e unhas
 - j. Higiene íntima feminina
 - k. Cuidados de higiene oral
 - l. Outros
- i) Dispositivos médicos.
- j) Medicamentos e produtos de uso veterinário.

2.5 Aprovisionamento e Armazenamento

2.5.1 Aprovisionamento

2.5.1.1 Gestão de encomendas

Existem dois tipos de encomendas: as que são geradas diariamente automaticamente pelo *software* SIFARMA 2000, consoante os produtos que são vendidos, isto é: cada produto existente na farmácia possui um *stock* mínimo e máximo - quando é atingido o valor de *stock* mínimo, é enviado automaticamente para a lista de encomendas diária, sendo a quantidade encomendada a necessária para atingir o *stock* máximo indicado no *software*, e existem também as encomendas realizadas por telefone, para ir ao encontro de um pedido específico do utente que não se encontre disponível na farmácia, ou que se encontre esgotado pelo fornecedor indicado na ficha de produto. O *stock* mínimo pode ser alterado consoante o dia ou qualquer circunstância especial (por exemplo: dias de serviço, onde há uma maior afluência de utentes, e maior saída de medicamentos urgentes (como anti-epiléticos, anti-convulsivantes, etc.), já que se prevê que nesse dia haja uma grande rotatividade e nº de vendas de certos produtos. A sazonalidade também é um factor importante na decisão de *stocks*, por exemplo: na altura da primavera/verão, é realizado um reforço nos *stocks* de medicamentos antialérgicos, comparativamente aos meses de inverno.

Em relação às encomendas realizadas por telefone, estas são geralmente consideradas urgentes e não são geradas automaticamente pelo *software*, pelo que necessitam ser geradas manualmente. Geralmente são criadas após a receção das mesmas, pelo que seguidamente são rececionadas, e a fatura conferida e assinada por quem a receciona.

A encomenda a Laboratórios é, geralmente, efetuada com respetivo comercial.

2.5.1.2 Seleção dos fornecedores

A *Farmácia Sant'Ana* funciona com os três seguintes armazenistas principais: PLURAL, ALLIANCE HEALTHCARE e COOPROFAR. São realizadas duas entregas diárias e, nos dias de serviço, também ao final do dia. Por serem sempre efetuadas à mesma hora é possível adiantar ao cliente quando poderá vir buscar o produto que encomendou ou deixou reservado.

A seleção dos fornecedores para cada medicamento é realizada consoante a proximidade dos mesmos, existência em *stock* do produto, mas principalmente pelos preços realizados por estes, sendo escolhidos para cada produto o laboratório de distribuição que proporcione o preço mais competitivo. Em relação a certos produtos, como cosméticos, certos suplementos alimentares, alguns produtos de grande procura sazonal e produtos com elevada rotatividade de *stock*, as compras são realizadas diretamente aos laboratórios dos próprios produtos - tais compras implicam um elevado impacto de capital, visto que existe a impossibilidade de se

adquirirem apenas pequenas quantidades de produto e as entregas são pouco frequentes, mas acabam por compensar relativamente às compras através dos laboratórios de distribuição.

2.5.1.3 Receção das encomendas

Relativamente à receção de uma encomenda que foi enviada por meio do *software*, a receção da mesma inicia-se pela sua identificação (pelo nº que a identifica), seguida da leitura do código de barras identificativo. Estes parâmetros variam consoante os laboratórios de distribuição provenientes.

É de extrema importância conferir detalhadamente a quantidade de embalagens disponibilizadas pelo laboratório de distribuição com a fatura indicativa do pedido, pois é comum a ocorrência de falhas quantitativas (geralmente embalagens em falta) ou incongruências qualitativas em relação ao pedido (confusão com embalagem semelhante...). No caso de se detetar alguma incoerência em relação à encomenda é necessário realizar uma reclamação com a máxima urgência de modo a regularizar a situação. Os outros parâmetros a serem verificados são o prazo de validade, preços (preços de venda à farmácia [PVF] e preços de venda ao público [PVP]) e integridade das embalagens, explicados mais adiante.

Os produtos de frio chegam em embalagens especiais térmicas, e são os primeiros a ser rececionados e armazenados. Caso este procedimento não se realize de imediato, são colocados no frigorífico num espaço distinto dos outros.

Antes de se terminar a receção da encomenda, é conferido o preço total da fatura com o obtido por nós - tal procedimento evita a ocorrência de erros na receção, como a não-atualização de algum PVF ou alguma embalagem por picar. Evidentemente a fatura pode não coincidir ao cêntimo com a obtida, por questões de arredondamento de preços ao cêntimo, ou outras causas.

Determinados produtos, em função da quantidade adquirida, permitem a oferta de bônus, sendo introduzidos no *stock* da mesma forma. A Farmácia paga o IVA (Imposto sobre o valor acrescentado) sobre a venda destes produtos.

As guias de remessa/faturas ficam arquivadas para posterior comparação com o resumo das faturas que o fornecedor envia à Farmácia mensalmente. Após o pagamento, o fornecedor envia o recibo que é arquivado juntamente com o resumo de faturas.

2.5.1.4 Preços

É necessário atualizar o PVF quando necessário (quando o presente na fatura difira do que se encontra no sistema informático), e ao realizar tal operação, é atualizada a margem de lucro para a farmácia. No ANEXO I encontram-se referidas as margens regressivas.

Para os medicamentos de venda livre a margem é, também livre para a farmácia. Por vezes é ajustado o PVP para facilitar o pagamento, sendo atualizada a margem automaticamente.

No momento da realização do estágio, as farmácias encontravam-se num momento de transição de preços PVF e PVP - nomeadamente um abaixamento do PVP de grande parte dos produtos, pelo que era necessário realizar uma cautelosa análise e atualização aos preços das embalagens rececionadas nas encomendas recentes. Apenas estas novas embalagens sofreram uma atualização do PVP - os mesmos produtos que já se encontravam disponíveis no *stock* da farmácia foram vendidos ao PVP definido no ato da sua compra, de modo a não haver prejuízo para a farmácia. O PIC é o preço presente na embalagem do medicamento. Hoje este já não é o preço de venda do medicamento, porque segundo uma nova portaria, este preço sofre uma dedução de 6%, fazendo com que o PMA (preço máximo autorizado), que pode ser igual ou superior ao PVP, seja inferior ao PIC.

2.5.1.5 Prazo de Validade

O prazo de validade é um dos parâmetros mais importantes a ser considerado na receção dos produtos encomendados, e o que é colocado no sistema informático é sempre o mais próximo de expirar. Ou seja, se houver em *stock* uma embalagem com prazo de validade mais curto que as que acabam de chegar na encomenda, esse valor não se altera. Caso não exista nenhuma embalagem em *stock*, o prazo de validade a ser colocado é o que se encontra presente nas embalagens recebidas.

Para além da disposição estratégica nos armários das embalagens consoante o seu prazo de validade (assunto discutido mais à frente), a farmácia mantém uma estratégia de rápida identificação dos produtos com prazo de validade próximos de expirar, por meio de um elástico na embalagem. É importante, de modo a se proceder a um escoamento prioritário destes produtos.

Ao início de cada mês é impressa uma listagem de todos os medicamentos com o prazo de validade a expirar nos dois meses seguintes. Assim, cada produto na lista é identificado no *stock* e conferido o seu prazo de validade. Se as embalagens tiverem um prazo superior ao indicado pelo *software*, é anotado o prazo de validade mais curto das embalagens presentes e este valor é atualizado no *software*. Enquanto às embalagens cujo prazo realmente confira com o das listagens, são colocadas de parte para se proceder a uma devolução ao laboratório de distribuição ou ao próprio laboratório de produção, consoante o produto.

2.5.1.6 Devoluções

São várias as situações em que é necessário devolver um produto ⁹:

- Devolução por prazo de validade;
- Devolução de divergências diárias;

- Devolução de acordo com circular.
 - Durante o estágio na farmácia, foi necessário proceder à devolução de um dado lote dos produtos *Prevenar* e *Rotatek*, como indicado por circular emitida pelo INFARMED.

A devolução de produtos de frio e estupefacientes é feita em separado.

Qualquer embalagem que tenha perdido a sua integridade necessita ser devolvida ao armazém de distribuição, sendo realizado um telefonema de reclamação e gerida devidamente a devolução do produto: emite-se uma nota de devolução com o motivo da devolução e o (s) produto(s) a devolver bem como o número e data da fatura a que o produto pertence. Também se pode realizar uma devolução quando é enviada à farmácia um produto que não foi pedido ou faturado.

A *nota de devolução* é impressa em duplicado (uma impressão fica na farmácia e a outra acompanha o produto para o fornecedor). O produto é então devidamente acondicionado e identificado como sendo para devolver.

Após a análise dos produtos devolvidos por parte dos fornecedores, estes podem emitir uma *Nota de Crédito*, na qual o produto vem identificado pelo nº de devolução e é devolvida a totalidade ou parte do valor do produto devolvido, mas podem também enviar um produto novo igual ao devolvido. Também se pode dar o caso de não aceitarem o pedido de devolução, e então o produto é remetido de novo à farmácia, sendo considerado uma quebra, com o respetivo prejuízo que daí advém. Todos estes casos são regularizados no *software*, na secção específica para o efeito.

2.5.1.7 Psicotrónicos, Estupefacientes e Benzodiazepinas

Cada encomenda rececionada com estes produtos é acompanhada de uma requisição, e o mesmo acontece para as benzodiazepinas, mas, dependendo dos fornecedores, mensalmente em forma de resumo ou com cada encomenda.

São enviadas duas cópias da requisição para psicotrónicos, estupefacientes e benzodiazepinas, que incluem o nº da fatura e encomenda correspondente, a data de envio (do medicamento e fatura), informação do produto e quantidade enviada, e a requisição é assinada pelo diretor técnico do armazém de distribuição proveniente. Posteriormente, o duplicado será assinado pela diretora técnica da farmácia, carimbado com o carimbo da farmácia e enviado de volta para o armazém de distribuição. O original, segundo a lei, deverá ficar disponível na farmácia durante um período de 3 anos.

2.5.2 Armazenamento

2.5.2.1 Disposição dos medicamentos

Na Farmácia Sant'Ana os medicamentos encontram-se dispostos segundo uma ordem lógica, em secções ou armários específicos, ordem esta que proporciona um atendimento mais rápido e direcionado.

No atendimento ao balcão existem alguns medicamentos disponíveis, nomeadamente, medicamentos não sujeitos a receita médica, sendo considerados como OTC's (Over-The-Counter): citemos analgésicos em doses baixas, medicamentos para doenças sazonais específicas, como xaropes e outras formas farmacêuticas para a tosse e expetoração, comprimidos para afeções específicas da garganta, diversos produtos para afeções do trato gastrointestinal, como antidiarreicos, laxantes e semelhantes, medicamentos específicos para a perda de peso, vitaminas e medicamentos energisantes, produtos calmantes e derivados naturais), que se encontram expostos no expositor detrás do balcão à vista do utente (bem como os produtos de uso veterinário, todas as pomadas e cremes dispostas em dois armários específicos, ordenadas por ordem alfabética de nome comercial, armário com conteúdo específico para plano nacional de Diabetes, xaropes e preparações extemporâneas para xaropes e soluções orais em dois armários, armário para preparações ginecológicas e intestinais, e por fim, armário com as diferentes marcas e dosagens de paracetamol em comprimidos e supositórios de diferentes princípios ativos no mesmo armário.

Na sala de espera encontram-se também nove expositores, cada um contendo produtos de um grupo específico. O primeiro armário contém produtos específicos para a gama capilar e de unhas (inclui produtos para a perda de cabelo e para fio capilar danificado ou frágil, sendo suplementos vitamínicos ou outras apresentações de uso tópico, champôs para piolhos, entre outros), o segundo armário possui uma vasta gama específica para a pele do bebé, também em conjunto com o terceiro armário, que além disso possui diversos produtos cosméticos para uso específico na gravidez ou afeções da pele, todos maioritariamente de uso tópico. O quarto armário possui produtos de alimentação específica para recém-nascidos, lactentes e crianças (apresentando leites em pó de diferentes composições que vão de encontro às necessidades nutricionais específicas do bebé, refeições prontas a comer, suplementos vitamínicos e outros suplementos alimentares para a mãe e criança), bem como alimentação específica para diabéticos. Os dois seguintes armários possuem várias gamas de dermocosmética de diversos laboratórios de renome. Por último, encontra-se um armário dedicado às gamas de solares, cuidados dos pés e mãos, um armário dedicado ao cuidado da higiene oral e íntima da mulher, e um armário com especialidades ortopédicas e outras especialidades de cuidados de feridas, como pensos e ligaduras, desinfectantes, etc.

Na área de receção de encomendas existe o armário principal, onde se encontram os medicamentos estupefacientes e psicotrópicos, medicamentos dispostos por ordem alfabética

da marca comercial ou DCI (Denominação Comum Internacional), no caso da secção dos medicamentos genéricos, e gavetas para medicamentos específicos: Genéricos dos inibidores da Bomba de prótons, Anticoncepcionais Orais, Medicamentos oftálmicos (colírios e pomadas oftálmicas), Aerosóis, Soluções injetáveis, Soluções orais, Ampolas bebíveis e medicamentos em saquetas, com granulados ou outras formas farmacêuticas cuja administração requer a dissolução prévia em água ou toma direta e sistemas transdérmicos.

Existe também o frigorífico para armazenar os produtos termolábeis, ou sensíveis ao frio até ao seu uso. A temperatura e humidade do frigorífico é estritamente controlada por sensores, conectados a um programa informático que faz o registo constante da temperatura.

Todos os medicamentos ou embalagens que não couberem no local de armazenamento específico e disponível para acesso imediato no ato de dispensa, são armazenados noutro local, o armazém, sendo repostos quando necessário ou solicitado.

A organização dos produtos é lógica nos termos do prazo de validade. Os que ficam mais expostos para a saída são os que têm o prazo de validade mais próximo de expirar. Nas gavetas existe uma ordem lógica da organização por prazo de validade.

2.5.2.2 Controlo de Temperatura e Humidade

Este é um parâmetro crucial relativamente à manutenção e controlo da integridade do medicamento no que respeita à sua estabilidade. Os prazos de validade são calculados com base em estudos acelerados que extrapolam a estabilidade a longo prazo para temperaturas entre os 23/24°C (T ambiente). Assim, torna-se fundamental manter um ambiente em que a maioria dos medicamentos se encontre a essa temperatura. A exceção são os medicamentos de frio. A temperatura é registada por vários sensores espalhados pela farmácia: um na zona de receção de encomendas, outro no armazém e finalmente no frigorífico. Esses sensores estão conectados a um dispositivo eletrónico e ao computador central, no qual está presente um *software* (HW4) que regista automaticamente a temperatura registada por cada sensor ao longo do tempo. Mensalmente são impressos os registos e validados. A T no frigorífico não deve ultrapassar os 8°C e nunca inferior a 2°C: esse controlo é realizado por um termostato que se aciona quando atinge os 6°C. Em relação à temperatura no armazém e na zona de receção de encomendas, não devem ser ultrapassados os 25°C. O controlo aqui é realizado manualmente, por meio de ar-condicionado, e a temperatura é mantida a 23/24°C. Já a humidade necessita ser mantida na ordem dos 60-65%.

É de extrema importância manter contacto regular com o termómetro afixado, para se ter uma percepção regular da temperatura nos três locais.

2.6 Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento

2.6.1 Comunicação Utente-Farmacêutico

O atendimento ao utente é transversal à imagem da farmácia. O utente que é atendido pelo farmacêutico necessita sentir que é bem recebido e acolhido nesta casa de saúde. Os princípios éticos são fundamentais, e definem esta interação tão essencial: cada utente é único, e necessita sentir-se como tal - é necessário adoptar posturas exclusivas consoante a avaliação de cada utente, dedicando-lhe exclusiva atenção e simpatia. Por vezes, será necessário um atendimento com precaução e paciência, em especial nas populações mais idosas, que podem necessitar de explicações em relação à medicação mais exaustivas e claras. O farmacêutico têm de assegurar-se que, de facto, o utente compreende as indicações da utilização dos medicamentos e, se for o caso, a utilidade para cada um. Tudo não passa apenas pelas explicações, mas pelo modo como se explica: o farmacêutico deve abster-se dos termos técnicos quando comunica com o utente, pois este dificilmente os iria compreender - por exemplo, em vez de referirmos às benzodiazepinas como “ansiolíticos”, podemos referir o termo “calmante”. É de extrema importância inquirir o utente se sabe como tomar a medicação e, caso se trate de uma medicação nova para ele, devemos ensinar calmamente como tomar, segundo a posologia referida pelo médico prescriptor. É muito comum escrever-se a posologia nas embalagens, por ser prático para o utente.

O estagiário representa uma cara nova que necessita ganhar a simpatia e confiança do utente - tal apreço ganha-se com uma postura sincera de simpatia e genuinidade, propondo-se a esclarecer qualquer dúvida que se tenha. Por vezes a timidez necessita ser ultrapassada por uma postura de confiança na comunicação para com o utente, já que uma afirmação acerca de um aconselhamento realizada com certa insegurança poderá multiplicar a insegurança por parte do doente no aconselhamento que esteja a receber, seja em relação a qualquer produto, medicamento ou outro aspecto.

2.6.2 Uso racional de Medicamentos

O farmacêutico durante a interação com o utente vai-se apercebendo de certos casos mais preocupantes: prescrição de medicamentos que interagem uns com os outros, casos de *non compliance*, deteção de reações adversas e contra-indicações: quando tais aspetos são detetados, é importante transmitir ao doente informação relativa a estas preocupações. Tal passo vai de encontro ao uso racional de Medicamentos. A promoção da leitura do folheto informativo é importante para que o doente conheça não só melhor a sua medicação mas também os aspetos de segurança relacionados com esta. Como referido acima, é também crucial inquirir ou informar o utente acerca da posologia e frequência da toma dos medicamentos, já que uma *non compliance* pode resultar em casos tanto de ineficácia da medicação ou casos de toxicidade.

No entanto, o uso racional de medicamentos não se trata apenas destes aspetos. Muitas vezes somos confrontados com casos ao balcão que constituem um desafio para o farmacêutico, no que respeita, num sentido lato, ao dizer “Não”. Tais casos são os de utentes que se dirigem à farmácia e pedem antibióticos sem receita médica “...porque da última vez que tomei me fez muito bem...” ou “...porque a minha vizinha me disse que era muito bom e que ficou boa...”, ou benzodiazepinas, sem indicação por parte do médico. É necessário não só rejeitar o medicamento ao utente nestas situações, mas, ao mesmo tempo, informar o porquê da nossa relutância na cedência a estes medicamentos, pelas razões científicas e sociais a eles associadas.

A promoção do uso racional de medicamentos também passa pela promoção de bons hábitos de toma dos medicamentos, quando é relevante referi-los, por exemplo: referir que descongestionantes nasais, na forma de derivados simpaticomiméticos não podem ser tomados durante mais de cinco dias (explicando o porquê ao doente - ou seja, efeito rebote), tomar os anti-inflamatórios não esteroides ao fim das refeições, tomar o antibiótico que o médico receitou até ao final da embalagem, mesmo que se sinta melhor aos primeiros comprimidos (salvo indicação médica contrária), entre outros aspetos.

2.6.3 Armazenamento domiciliário de medicamentos

Devemos informar o utente que os medicamentos se devem guardar em lugar fresco e seco, fora do alcance das crianças e longe da luz solar e, caso seja um produto de frio, que o leve o mais rapidamente para casa e o coloque no frigorífico.

2.6.4 Farmacovigilância

A farmacovigilância é o auge do aconselhamento ao utente. Requer uma elevada preparação científica do farmacêutico que a realiza e, de preferência, deverá ser realizada de modo privado com o utente, a medicação analisada cautelosamente, segundo vários métodos, como é o Método de Dader, desenvolvido pela Universidade de Granada.

No entanto, a farmacovigilância pode também passar por passos que não quererem o utente, nomeadamente, a leitura de boletins de farmacovigilância, regularmente cedidos pelo INFARMED, e o farmacêutico deve também detetar e notificar as seguintes situações:

- Todas as suspeitas de reações adversas graves, mesmo as já descritas;
- Todas as suspeitas de reações adversas não descritas mesmo que não sejam graves;
- Todas as suspeitas de aumento da frequência de reações adversas (graves e não graves),

Seja por análise ou identificação destas situações nos utentes, seja por queixa por parte dos mesmos.

2.6.5 VALORMED

A farmácia possui um contrato com a Valormed, que fornece ecopontos onde os utentes podem colocar embalagens de medicamentos fora de validade, ou que já não irão utilizar. Quando o contentor atinge a sua máxima capacidade, é selado, identificado com o nome da farmácia e seu número identificativo, assinado pelo operador e colocada uma estimativa do peso do contentor cheio. Posteriormente será devolvido à Valormed por intermédio dos laboratórios de distribuição que também possuam contratos com a Valormed e substituído por um contentor vazio. Os duplicados das fichas dos contentores são posteriormente guardados na farmácia por tempo indefinido.

2.7 Dispensa de medicamentos

2.7.1 Medicamentos de uso Humano

O Estatuto do Medicamento (Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto) define medicamento como: *“Toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas.”*

Os medicamentos a ser dispensados na farmácia podem ser sujeitos a dispensa mediante receita médica obrigatória (MSRM), sendo ou não comparticipados pelos diferentes sistemas de saúde, ou podem ser não sujeitos a receita médica (MSRM), que não são comparticipados, salvo raras exceções. Estes últimos medicamentos já não são de venda exclusiva nas farmácias, o que pode resultar em problemas graves de saúde pública, pois o facto de serem MNSRM não significa que sejam absolutamente seguros - muitos destes medicamentos ainda provocam interações graves com outros medicamentos - é e continua a ser crucial um bom aconselhamento por parte do farmacêutico no respeitante a esta categoria de medicamentos.

Os pontos discutidos na secção anterior devem predominar na parte da dispensa de medicamentos.

2.7.2 Receitas médicas

No momento da realização do estágio esteve a ser implementada uma nova medida relativamente às receitas médicas, definida pela Portaria 137A-2012 de 11 de Maio, em que é introduzida a prescrição por DCI. A medida ainda não está a ser implementada pelos médicos de momento, mas estará, num futuro próximo, completamente em vigor.

2.7.2.1 Elementos presentes na receita médica

Segundo o Despacho n.º 14/95, de 22 de Maio, devem constar como elementos obrigatórios numa receita médica os seguintes pontos, essenciais para a sua validação:

- O nome do utente, o seu número de identificação atribuído pelo respetivo centro ou extensão de saúde, bem como, caso exista, a menção a um regime especial de comparticipação de medicamentos;
- A identificação do centro ou extensão de saúde referido na alínea anterior;
- A identificação dos medicamentos prescritos, até ao número máximo de quatro, bem como a respetiva quantidade, até ao limite de quatro embalagens;
- O nome e assinatura do médico prescriptor, bem como a respetiva etiqueta de identificação profissional com código de barras;

- A data da prescrição.

No ato de aviamento da receita a farmácia deve confirmar, para efeitos de acesso à comparticipação de medicamentos pelo SNS, a exatidão da referência ao direito do utente ao regime especial de comparticipação de medicamentos ou a outros regimes de comparticipação de medicamentos legalmente previstos, através dos documentos comprovativos emitidos pelos serviços competentes.

Segundo escrito por lei, na *Portaria n.º 1501/2002, de 12 de Dezembro*, podem ser prescritas numa só receita:

- a) Até duas embalagens do mesmo medicamento
- b) Até quatro embalagens no caso de os medicamentos prescritos se apresentarem sob a forma de embalagem unitária, entendendo-se por tal, aquela que contém uma unidade de forma farmacêutica na dosagem média usual para uma administração.

2.7.2.2 Interpretação da receita médica

Hoje, com a obrigatoriedade da prescrição das receitas de modo informatizado (ou seja, escritas a computador), a interpretação da prescrição encontra-se bastante facilitada para o farmacêutico: maior facilidade na leitura, e, especialmente, identificação ótica dos medicamentos prescritos - tornam-se mínimos os erros na dispensa das embalagens, em especial nas dosagens, nº de comprimidos, etc. No entanto, ainda nos dias de hoje é possível encontrar receitas médicas escritas à mão, que se encontram devidamente identificadas com a exceção respeitante, por não virem informatizadas. A caligrafia de alguns médicos torna a interpretação destas receitas um verdadeiro desafio para o farmacêutico. A prescrição por DCI irá abolir a presença do código de barras identificativo dos medicamentos nas receitas, visto que não será prescrito um medicamento específico, salvo nas devidas exceções apresentadas na portaria descritiva.

Existem algumas regras para o aviamento de receitas que visam salvaguardar a saúde dos utentes e o uso racional dos medicamentos. Por exemplo, quando o médico não especifica o tamanho de embalagem deve dispensar-se a mais pequena, ou quando não especifica a dosagem deve dispensar-se a menor dosagem comercializada.

Por vezes o utente não deseja comprar todos os medicamentos prescritos na receita médica, portanto, cabe a ele decidir quais dos medicamentos aviar. Os medicamentos que sofreriam comparticipação e que não são aviados, devem ser levemente rasurados, para não haver uma má interpretação na revisão das receitas, quando se confirma o prescrito com o cedido (que é impresso no verso da receita) - tal ajuda a despistar erros na dispensa, como por exemplo, cedência dos medicamentos e ausência da sua faturação.

Antes de ceder o medicamento, deve confrontar-se o utente para tentar perceber a quem se destina a terapêutica, se a pessoa em questão conhece a medicação e para que esta foi

prescrita. É também importante questionar ao utente se sabe como tomar os medicamentos, ou seja, se sabe a dosagem e frequência da toma, sendo frequente escrever-se na embalagem o modo de toma. Para finalizar o atendimento, é realizada a impressão na parte de trás da receita com os medicamentos cedidos e compartilhados. Pede-se ao utente para assinar no local apropriado, e seguidamente, na farmácia Sant'Ana, as receitas são reservadas para posterior revisão pelos funcionários, e aí é carimbada a receita e colocada a data da dispensa dos medicamentos na receita. Posteriormente são revistas de novo e assinadas pelo farmacêutico responsável. Este processo de revisão múltipla das receitas minimiza grandemente o seguimento de receitas com erros, sejam estes provenientes do médico ou ocorridos na própria farmácia e permite a sua correção a tempo: caso o erro tenha consequências para o utente, este é prontamente contactado e comunicado em relação ao erro, para que se possa resolver.

2.7.2.3 Quando se poderá dispensar um medicamento genérico na receita médica?

Segundo a *Portaria n.º 1501/2002, de 12 de Dezembro*, sempre que o médico prescriptor considere haver motivos para autorizar ou não autorizar a dispensa de um medicamento genérico em vez do medicamento prescrito, deverá assinalar esta sua decisão no local próprio para o efeito. O não preenchimento ou o preenchimento simultâneo dos dois campos que constam do rodapé da receita médica equivalem à concordância do médico com a dispensa do medicamento genérico.

Se o doente preferir trocar um medicamento de marca que venha receitado por um genérico, e que o médico tenha aprovado a sua troca, este deve assinar a receita (em espaço apropriado para o efeito) para que fique provado o seu consentimento.

Quando não é possível disponibilizar ao utente o medicamento prescrito pelo médico, seja por inexistência do produto em causa (embalagens com quantidades de comprimidos diferente, dosagens diferentes, regimes diferentes - como é o caso de embalagens de pílulas para 3 meses, quando só existe para 1 mês) ou outra causa (inexistência de stock), pode ceder-se um medicamento equivalente, respeitando o descrito por lei. O mais comum é que não se possua, para um genérico, o laboratório prescrito pelo médico, e se tenha de proceder à substituição por outro medicamento genérico (caso a receita não venha trancada pelo médico). A lei obriga a que nestes casos se ceda o genérico mais barato que se tenha em *stock*, e a farmácia é obrigada a possuir em stock 3 dos 5 medicamentos genéricos mais baratos, dentro do mesmo grupo homogéneo.

Alguns exemplos:

- Inexistência de Nimesulida 30comprimidos: ceder uma ou duas embalagens de Nimesulida 20 comprimidos.

- Inexistência de embalagem de Yasminelle para 3 meses: ceder duas embalagens de Yasminelle para 1 mês
- Inexistência de Paracetamol 750mg: ceder uma embalagem de Paracetamol 500mg.
- Não existe em *stock* Carvedilol Labesfal - é cedido Carvedilol de outro laboratório, o mais barato.

2.7.2.4 Organização das receitas

Todas as receitas são separadas pelos organismos de participação, e posteriormente por lotes e número. Todas as receitas necessitam estar assinadas pelo médico prescriptor, e o que foi cedido tem de estar em concordância com o prescrito. Algumas exceções podem ser aceites, como ceder um medicamento equivalente (um genérico de outro laboratório quando o prescrito não está disponível), ou quando o nº de comprimidos da embalagem foi atualizado. Também tem de conferir o nº de embalagens cedidas com as prescritas, excetuando se o utente não quis levar todas as embalagens prescritas. Nesse caso o farmacêutico deve rasurar na receita o medicamento que não será cedido no momento do atendimento para evitar confusões no momento de revisão do receituário.

2.7.3 Vendas Suspensas e a crédito

Existem ainda duas modalidades de venda para casos específicos: a venda suspensa e a venda a crédito. Realiza-se uma venda suspensa no caso de o utente não pretender levar todos os medicamentos ou todas as embalagens de uma só vez ou quando existe falha no *stock* e não possa ser resolvida do modo referido acima (por exemplo, caso venha a receita trancada). Neste caso são impressos dois talões de confirmação de venda suspensa (um para a Farmácia e outro para o utente), ou quando quer levar um medicamento que seja necessário urgentemente, e se compromete a trazer a receita mais tarde para regularizar. Neste caso, o utente paga a totalidade do medicamento, sem qualquer participação. Quando o utente pretender levar as restantes embalagens, ou receber o dinheiro da participação, apresenta o talão com o nº da venda suspensa de modo a regularizar a situação. A realização de uma venda a crédito aplica-se a utentes com conta na Farmácia. Estes, geralmente, são clientes da Farmácia que pagam a medicação no final do mês.

2.7.4 Receitas médicas especiais - Estupefacientes e Psicotrópicos

Os psicotrópicos e estupefacientes constituem um grupo de medicamentos com os quais é necessário ter cuidados especiais: para além de poderem acarretar perigos para a saúde quando administrados sem correta orientação médica, são frequentemente cobizados e objeto de tráfico. O seu regime jurídico é estabelecido pelo Decreto-Lei n.º 15/93, de 22 de Janeiro e suas alterações e Decreto Regulamentar n.º 61/94, de 12 de Outubro. A Portaria n.º 981/98, de 8 de Junho estabelece as medidas de controlo de estupefacientes e psicotrópicos.

Antigamente, as receitas para psicotrópicos e estupefacientes eram amarelas e em triplicado, mas hoje têm o mesmo formato das receitas normais, e é apenas passada uma via. Para a cedência de medicamentos deste tipo mediante a receita, é necessário comprovar se a pessoa a quem se dispensa é o que irá usufruir da medicação ou não. No ato de dispensa, mediante o sistema informático, fica registada a informação do utente quem se destinam os medicamentos: a sua morada completa, nº de identificação do B.I. ou Cartão de Cidadão e idade, bem como ao utente a quem se destina a medicação. É também colocado o nome do médico prescritor.

Estas receitas só podem ser dispensadas pelo Farmacêutico, ou sob sua supervisão.

As receitas são numeradas informaticamente e são obtidos três documentos: documento de faturação e dois documentos de psicotrópicos posteriormente agrafados à fotocópia que se tire à receita médica.

Para a faturação, o original é enviado à entidade competente (ARS, por exemplo) e à fotocópia são anexados os documentos de psicotrópicos que ficam na Farmácia (arquivado três anos por ordem de dispensa).

Este tipo de medicamentos é sujeito a um controlo de entradas e saídas mensalmente, sendo também obrigatório o balanço anual.

2.7.5 Comparticipação de Medicamentos

2.7.5.1 Regimes de comparticipação

São diversos os organismos, regimes de comparticipação sistemas e seguros de saúde que podem constar nas receitas com efeitos de se obter comparticipação nos medicamentos a aviar. O farmacêutico necessita saber identifica-los para registar corretamente no *software* o regime, de modo a que o utente usufrua da comparticipação a que tem direito. O regime de comparticipação mais comum é o Sistema Nacional de Saúde (SNS). Neste regime, o Estado paga uma percentagem do preço dos medicamentos (95%, 69%, 37%, 15%) sobre o preço de referência, que é calculado pela média dos 5 medicamentos mais baratos do grupo homogéneo, e consoante a sua classificação fármaco-terapêutica (Portaria n.º 1474/2004, de 21 de Dezembro), exceto os considerados indispensáveis à vida humana (caso da insulina, comparticipada a 100%). Para além do SNS existem muitos outros organismos comparticipadores: ADME (Assistência na Doença aos Militares do Exército), SAD/PSP (Serviço de Assistência a Doenças), SBC (Sindicato de Bancários do Centro), entre outros. Os produtos do protocolo de diabetes, como lancetas, agulhas, entre outros, são comparticipados por um regime especial, identificado pelo código DS, se pertencente ao SNS. A maioria dos medicamentos fazem parte do escalão C (37% de comparticipação no SNS).

Existem alguns regimes que permitem que os utentes levem os medicamentos sem qualquer custo para eles. Dentro destes faz parte um regime de comparticipação bastante comum na

zona da Beira Interior, em especial na Covilhã é o regime dos Lanifícios, que são um regime de complementaridade. Todos os trabalhadores dos lanifícios que fizeram descontos durante o seu tempo de trabalho usufruem agora de regime de participação completo.

2.7.6 Medicamentos Genéricos e Preços de referência

«Preço de referência» é o valor sobre o qual incide a participação do Estado no preço dos medicamentos incluídos em cada um dos grupos homogêneos, de acordo com o escalão ou regime de participação que lhes é aplicável;

«Grupo homogêneo» é o conjunto de medicamentos com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias activas, dosagem e via de administração, com a mesma forma farmacêutica ou com formas farmacêuticas equivalentes, no qual se inclua pelo menos um medicamento genérico existente no mercado, podendo ainda integrar o mesmo grupo homogêneo os medicamentos que, embora não cumprindo aqueles critérios, integrem o mesmo grupo, ou subgrupo, farmacoterapêutico e sejam considerados equivalentes terapêuticos dos demais medicamentos que daquele grupo fazem parte.

2.8 Automedicação

A farmácia é o local de eleição dos utentes que esperam um alívio rápido de alguns sintomas ou doença que padecem num determinado momento. O rápido atendimento por parte do farmacêutico, e a confiança nos seus conhecimentos científicos, fazem com que os utentes se desloquem a este local de saúde em detrimento do médico, para a resolução de males menores, como sintomas gripais, dores musculares, articulares ou de cabeça, sintomas de obstipação, diarreias, e também na busca de medicamentos preventivos de certas situações - fadiga psicológica, imunitária e física, entre diversos outros casos.

Segundo o Despacho nº 17 690/2007, a automedicação é a utilização de medicamentos não sujeitos a receita médica de forma responsável, sempre que se destine ao alívio e tratamento de queixas de saúde passageiras e sem gravidade, com a assistência ou aconselhamento opcional de um profissional de saúde, e encontra-se regido também por este despacho quais as situações passíveis de automedicação, estando estas situações descritas no ANEXO II.

Muitos utentes sabem previamente o que querem levar à partida, e referem ao farmacêutico o nome do medicamento que querem aviar. Cabe ao farmacêutico ou outro profissional de saúde a atender o utente, validar o estado de saúde do utente, para confirmar se, de facto, essa será a via mais exequível de tratamento, ou se será mais conveniente dispensar outra especialidade, ou proceder a um diferente aconselhamento: é importante promover as medidas não farmacológicas ao doente. Quando a situação se puder resolver sem o recurso a medicamentos, devemos enfatizar isso mesmo ao utente. Haverá outras situações em que o mais aconselhável será a remissão ao médico: é bastante comum em casos de mães que vêm pedir aconselhamento para certas afeções que sofrem os seus filhos com idades ainda inferiores a 2 anos. Como sabemos, as especialidades de medicamentos MNSRM não são inócuas, pelo que todo o cuidado na cedência destes medicamentos é essencial. Além disso, há que ter em conta que a automedicação pode mascarar sintomas, dificultar ou atrasar o diagnóstico e resoluções terapêuticas, bem como favorecer o aparecimento de reações adversas e/ou interações medicamentosas.

Posto isto, há então, uma série de questões a serem colocadas ao utente, para se conseguir chegar a um consenso na decisão do farmacêutico em relação à sua situação, tentando enquadrar a situação numa possível situação passível de aplicação de automedicação mediante a lei:

- Quais os sintomas de que se queixa?
- Qual a intensidade dos sintomas?
- Há quanto tempo surgiram esses sintomas?
- Já havia passado por alguma situação semelhante?
- Existem outras patologias (ex: diabetes, hipertensão, patologias cardíacas, hepáticas ou renais...)?

- Toma medicamentos cronicamente? Quais?
- Já tomou algumas medidas terapêuticas? Qual foi o resultado?
- Tem alguma alergia?

Tomemos o seguinte exemplo passado na farmácia de estágio, um exemplo bastante comum que seguramente se repetirá em diversas farmácias ao longo do país:

Chega um utente à farmácia que quer que se lhe dispense um medicamento para a gripe. Perguntamos: “Já anda a tomar qualquer coisa para a gripe?” - “Sim, tomei um Ben-U-Ron®, mas não me ajudou grande coisa...” - “Que Ben-U-Ron® era? De 500mg ou 1g? E então, que sintomas apresenta?” - “Ah...era de 500mg, só tomei um de manhã... Tenho tosse seca, pingo do nariz, tenho dores...” - “Não estava a tomar a dose certa! Tinha de tomar 3x ao dia, e talvez tivesse de tomar 2 comprimidos! Então, vai levar aqui o Griponal® para a gripe, que já tem o Ben-U-Ron®, e também ajuda a não pingar do nariz, e vai levar um xarope para a tosse, o Bisoltussin®! Não se esqueça de beber bastantes líquidos, e tome o Griponal num máximo de 5 dias (possui o simpaticomimético), 3x ao dia! Se não se sentir melhor, vá ao seu médico!”

Neste caso, certas perguntas poderiam ser omitidas, pois a dosagem de paracetamol do Griponal® não era muito elevada e tais perguntas poderiam tornar-se enfadantes para o doente, sem necessidade.

Outro caso mais grave na cedência de medicamentos sem indicação médica é a Pílula do Dia Seguinte (contraceção hormonal de emergência). Nestes casos é necessário colocar uma série de questões, nomeadamente há quanto tempo foi a relação sexual, se há alguma possibilidade de já estar grávida, altura do ciclo menstrual, se foi usado algum método contraceptivo, se já alguma vez recorreu à contraceção de emergência, entre outras... É necessário elucidá-la para o facto de este não ser um método de contraceção, e que os riscos para a sua saúde são elevados, sobretudo com tomas repetidas. Se realmente não se tiver tratado de um infeliz acidente (o preservativo rompeu-se, teve uma diarreia a tomar a pílula...) devemos alertá-la para a existência dos diferentes métodos contraceptivos existentes, da sua segurança e funcionalidade. É importante que a cedência deste medicamento seja feita de forma segura, e informar a doente do modo de toma.

2.9 Aconselhamento e dispensa de outros produtos de saúde

2.9.1 Produtos de dermofarmácia, cosmética e higiene

Segundo o Decreto Lei nº 296/98, de 25 de Setembro, entende-se por Produto cosmético e de higiene corporal: qualquer substância ou preparação destinada a ser posta em contacto com as diversas partes superficiais do corpo humano, designadamente epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos, ou com os dentes e as mucosas bucais, com a finalidade de, exclusiva ou principalmente, os limpar, perfumar, modificar os eu aspeto e ou proteger ou os manter em bom estado e ou de corrigir os odores corporais. Este decreto regula ainda diversos outros aspetos relacionados com os produtos cosméticos, que sofrem uma legislação diferente da dos medicamentos de uso humano.

Muitas vezes durante o atendimento ao balcão chegaram prescrições médicas para certos produtos inseridos na definição anterior. Destinam-se muitas vezes ao tratamento de afeções tópicas, tratamentos de dermatites da fralda nos bebés ou idosos acamados, entre outros. Obviamente, estes produtos não sofrem comparticipação, sendo a receita médica meramente informativa nestes casos. Com a chegada da Primavera e do Sol, aumentou a afluência de utentes a procurarem produtos na gama dos protetores solares. É importante que as pessoas estejam cada vez mais sensibilizadas para este problema de saúde pública - o aumento da incidência de cancro da pele relacionados com a exposição ao Sol não protegida.

Também podemos aconselhar este tipo de produtos aos utentes que se dirijam à farmácia, tendo em atenção o tipo de afeção ou situação que desejem resolver. Existem diversas gamas de produtos apropriadas para cada situação - mais que ter conhecimentos científicos nesta área, é mais importante ser-se conhecedor das gamas existentes no mercado e na farmácia. Existe sempre um produto certo para a pessoa e condição certa e, tal como para um medicamento, devemos instruir o utente acerca do modo correto de administração e eventuais efeitos adversos.

No entanto, temos de ter o discernimento de saber observar casos cujo tratamento com um produto de dermocosmética não seja suficiente, e cujo caso requeira a remissão ao médico.

2.9.2 Produtos dietéticos para alimentação especial

A alimentação especial, bem como os suplementos alimentares, encontram-se regulados pelo Ministério da Agricultura. Consideram-se géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial aqueles que, devido à sua composição especial ou a processos especiais de fabrico, se distinguem claramente dos alimentos de consumo corrente, sendo adequados às necessidades nutricionais especiais de determinadas categorias de pessoas e comercializados com a indicação de que correspondem a esse objetivo.

Estes alimentos devem cumprir as disposições obrigatórias aplicáveis aos géneros alimentícios de consumo corrente, salvo quanto às alterações previstas pelo regime legal específico estabelecido pelo Decreto-lei n.º 74/2010, de 21 de Junho. São ainda regulados por legislação específica bem como pela legislação aplicável aos alimentos comuns nos aspetos que não contrariam a legislação específica.

Segundo o disposto no *website* do Ministério da Agricultura, a alimentação especial diz respeito às necessidades nutricionais especiais de:

- Pessoas cujo processo de assimilação ou cujo metabolismo se encontrem perturbados. Como exemplo, temos os géneros alimentícios especialmente adaptados a pessoas diabéticas, com intolerância ao glúten ou os alimentos com fins medicinais específicos;
- Pessoas que se encontram em condições fisiológicas especiais e que, por esse facto, podem retirar benefícios especiais de uma ingestão controlada de determinadas substâncias contidas nos alimentos. Como exemplo referem-se os alimentos com valor energético baixo ou reduzido destinados ao controlo de peso, os alimentos adaptados a esforços musculares intensos, etc;
- Lactentes (crianças até aos 12 meses de idade) ou crianças de pouca idade (dos 12 aos 36 meses) em bom estado de saúde.

Nos dois primeiros casos, os alimentos podem ser qualificados como alimentos «dietéticos» ou «de regime».

Segundo o Despacho nº 14319/2005, de 29 de Junho, foram definidos que os alimentos especiais para pessoas com erros congénitos do metabolismo (do grupo das aminoacidopatias, acidúrias orgânicas, doenças do ciclo da ureia, défices da β -oxidação dos ácidos gordos, nomeadamente fenilcetonúria, hiperfenilalaninemia, leucínose, homocistinúria, tirosinemias, hiperlisinemia, acidúria argininosuccínica, acidúria propiónica, acidúria metilmalónica, acidúria isovalérica, acidúria 3-hidroxi-3-metilglutárica, acidúria glutárica do Tipo I, citrulinemia, défice em OCT, défice em CPS I, argininemia, e galactosemia) podem ser compartilhados. A lista dos alimentos encontra-se em anexo (Anexo III).

2.9.3 Produtos dietéticos infantis

A população pediátrica consta ser bastante exigente em vários aspectos, sendo um deles a própria alimentação. A existência de várias condições naturais nesta população, e propensão à criação de alergias alimentícias levam a que os cuidados na alimentação sejam redobrados, e que haja uma diversa gama de produtos inseridos nesta categoria.

Para a alimentação do bebé, existem fundamentalmente leites (mais direccionados aos lactentes) e farinhas lácteas.

Os leites com características especiais existentes na Farmácia podem ser:

- **Alimentação normal:** constituídos por 70% de lactose e 30% de maltodextrinas de assimilação lenta garantem a satisfação entre biberões sem que haja indisposições.
- **Anti-obstipantes:** constituídos na totalidade por lactose, aumentam a osmolaridade e o teor de água nas fezes, são ricos em cálcio, fósforo e magnésio, iões fundamentais para a motilidade gastro-intestinal.
- **Anti-cólicas:** constituídos por 1/3 de lactose e 2/3 de maltodextrinas evitam o excesso de lactose no cólon, responsável pela fermentação e formação de gases que originam as cólicas.
- **Saciedade:** constituídos por mais açúcares de absorção lenta (que evitam hipoglicémias que provocam a sensação de fome no bebé), ácidos gordos de cadeia longa, 40% lactose, 25% de maltodextrinas, 25% de amido de milho e 10% de glucose.
- **Anti-regurgitantes:** só espessam no estômago devido à sua constituição em amido de milho pré-gelatinizado que precipita a pH ácido; os triglicéridos de cadeia média facilitam o esvaziamento gástrico.
- **Hipoalergénicos:** são formulações parcialmente hidrolisadas, de sabor e odor aceitáveis.
- **Antidiarreicos:** não têm lactose nem sacarose, mas sim frutose e pectinas de banana e maçã para estimular o apetite. São enriquecidos com sódio, cloro e potássio. Usam-se por 5 dias, ao fim dos quais se faz a transição gradual para a fórmula habitual.

Existe legislação específica estabelecida a nível europeu para este tipo de alimentação, que define a quantidade energética a ser fixada, teor proteico, lipídico, de glícidos, substâncias minerais e vitaminas.

O Farmacêutico perante a solicitação deste tipo de produtos deve informar o utente que o leite materno é sempre preferível, exceto em determinadas situações por indicação médica. As vantagens e importância do leite materno para o bebé devem ser referidas.

2.9.4 Fitoterapia e suplementos nutricionais (nutracêuticos)

A fitoterapia é um método terapêutico que utiliza as plantas, mais exatamente, a parte ativa das plantas, e tais produtos podem encontrar-se sob a forma de chás, comprimidos, cápsulas, ampolas bebíveis entre outras diversas apresentações farmacêuticas. Existem diversos utentes que fazem uso deste poder das plantas para alívio de sintomas e cura de algumas patologias. Sem dúvida a utilização mais ampla da fitoterapia por parte dos utentes é nos produtos de alívio de sintomas de obstipação (Sene, Cáscara Sagrada...) e na procura de ansiolíticos naturais (valeriana, passiflora), mas também são usados na estimulação de funções cognitivas (Ginkgo biloba, ginseng...), emagrecimento (chá verde, casca de laranja amarga...), loções capilares cosméticas (camomila) entre diversas outras variedades e plantas, inseridas em suplementos alimentares. Apesar de não substituírem um regime alimentar completo e equilibrado, os suplementos alimentares podem ser uma ajuda ao bem-estar físico e mesmo psicológico dos utentes.

É errado pensar que o uso de produtos naturais é inofensivo ou inócuo. Podem produzir-se diversas interações medicamentosas, em especial se o utente é polimedicado. Por exemplo, o Hipericão, apresentando propriedades ansiolíticas e antidepressivas, é um potente indutor do CYP3A4, pelo que pode reduzir a eficácia de certos medicamentos, como a pílula contraceptiva. Recentemente surgiram estudos que comprovam o mesmo acontecimento para doses de vitamina C iguais ou superiores a 1g diárias. A toranja, pelo contrário, é um inibidor do CYP, pelo que pode provocar aumento das concentrações plasmáticas de diversos medicamentos, podendo produzir-se acumulação de concentrações tóxicas dos mesmos no organismo. O carvão vegetal, ao impedir a absorção dos fármacos no trato intestinal, irá também diminuir ou anular as suas ações. Compete a nós, farmacêuticos, desmistificar e aconselhar correta e cautelosamente este tipo de produtos.

2.9.5 Medicamentos de uso veterinário

Segundo descrito pelo Decreto-Lei n.º 148/2008, entende-se por Medicamento de Uso Veterinário: *toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no animal, com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário ou, exercendo uma acção farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas.*

A farmácia Sant'Ana possui uma generosa gama de medicamentos de uso veterinário, indicados para diversas indicações terapêuticas - tratamento de patologias animais, prevenção de patologias animais, regulação do ciclo éstrico de gatas e cadelas, antiparasitários, etc. A dispensa deste tipo de medicamentos realiza-se mediante a apresentação de receitas médico-veterinárias, embora haja alguns tipos de produtos que podem ser aconselhados pelo farmacêutico para os animais.

2.9.6 Dispositivos Médicos

Segundo o Decreto-Lei nº 30/2003, de 14 de Fevereiro, entende-se por dispositivo médico: qualquer instrumento, aparelho, equipamento, material ou artigo utilizado isoladamente ou combinado, incluindo os suportes lógicos necessários para o seu bom funcionamento, destinado pelo fabricante para ser usado no corpo humano para fins de:

- Diagnóstico, prevenção, monitorização, tratamento ou atenuação de uma doença;
- Diagnóstico, monitorização, tratamento ou atenuação ou compensação de uma lesão ou deficiência;
- Investigação, substituição ou modificação da anatomia ou de um processo fisiológico;
- Controlo da concepção

e cujo principal efeito pretendido no corpo humano, não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por estes meios.

Podem-se classificar em 3 categorias, cujo conteúdo, ou seja, os produtos inseridos em cada uma delas, podem ser consultados no site do INFARMED e no ANEXO IV:

- Dispositivos médicos de classe I, dispositivos de baixo risco;
- Dispositivos médicos de classe IIa e IIb, dispositivos de médio risco, sendo os de classe IIa de baixo médio risco e os de classe IIb de alto médio risco;
- Dispositivos médicos de classe III, dispositivos de alto risco.

2.10 Outros cuidados de saúde prestados na farmácia Sant'Ana

A farmácia Sant'Ana oferece aos seus utentes uma vasta gama de cuidados de saúde, realizados na sala de atendimento ao utente, com as condições de privacidade adequadas. A todos os utentes oferece-se um boletim onde se anotam os resultados dos testes, que é muito útil para a avaliação da evolução do estado de saúde do utente pelo farmacêutico. Os cuidados são depois pagos pelo utente. Para cada caso, se se der a confirmação de resultados menos favoráveis, ou fora do normal, deve-se sempre instruir o doente à adopção de estilos de vida saudáveis, ou encaminhamento ao médico, caso os valores estejam demasiado distantes dos considerados normais. Nesses casos poderá ser necessária a instauração de uma medicação adequada, ou caso o doente já a tome, a sua alteração, reformulação ou aumento de dosagens.

2.10.1 Medição da Glicémia

Este teste é rapidamente realizado. O utente necessita estar em jejum para a obtenção de resultados precisos. Pica-se com uma lanceta um dos dedos do utente para a obtenção de sangue para o teste, embebe-se a tira que será colocada no aparelho de medição da glicémia no sangue, e a máquina, em segundos, oferece o resultado da glicémia. Todo o material contaminado é descartado em recipientes próprios.

Existem diversas tabelas com os valores de glicémia padrão adequados em cada situação. De um modo geral, e segundo o ministério da saúde português, poderemos considerar que os valores de glicémia normais são:

- Glicemia em jejum: inferior a 110 mg/ml
- Glicemia pós prandial: inferior a 140 mg/dl
- Para o caso de um doente que possa apresentar diabetes, os valores já irão diferir:
- Glicemia em jejum: superior a 126 mg/ml, em duas ocasiões separadas de curto espaço de tempo
- Glicemia pós prandial: superior a 200 mg/dl

2.10.2 Medição dos Triglicéridos e Colesterol

Para a medição destes valores é importante que o utente guarde jejum entre 9 a 12 horas (sem beber ou comer), sobretudo para os Triglicéridos. Os valores de colesterol total devem ser, na maioria dos casos, inferiores a 200 mg/dl. Estes valores andam sob discussão a nível mundial, e o valor limite tem vindo a diminuir para os 160 a 180 mg/dl.

Temos assim para os níveis de colesterol total:

- < 200 mg/dl, desejável (irá mudar para < 180 ou 160 mg/dl)
- 200 - 239 mg/dl, normal alto
- ≥ 240 mg/dl, elevado

Em relação aos triglicéridos, os valores normais encontram-se na ordem de < 150 mg/dl.

O aparelho de medição do colesterol e triglicéridos é o mesmo na farmácia Sant'Ana. O protocolo é semelhante ao da medição da glicémia, sendo necessário picar o doente para a obtenção de uma amostra de sangue, e colocar em duas tiras diferentes, uma para cada efeito. A máquina posteriormente dará o valor dos triglicéridos e colesterol.

2.10.3 Medição da tensão arterial

Na farmácia este teste é bastante requisitado. Mais comumente é realizado com auxílio de uma máquina automática, onde é medida por meio da artéria braquial. O utente é aconselhado a descansar antes de se realizar o teste da tensão arterial, durante o mesmo, deve permanecer em repouso, calmo e não deve falar. Os valores para a tensão arterial são os seguintes, segundo o Joint National Committee 7 (JNC 7)¹⁰:

Classificação	Pressão sistólica (mmHg)		Pressão diastólica (mmHg)
Ótima	<120	E	<80
Pré-Hipertensão (Normal)	120 - 129	E	80 - 84
(Normal-Alta)	130 - 139	E	85-89
Hipertensão Estádio 1	140 - 159	Ou	90 - 99
Hipertensão Estádio 2	≥ 160	Ou	≥ 100

Caso os valores se encontrem mais altos que o normal, deve-se inquirir o utente acerca dos comportamentos de risco, e encorajar a adopção de estilos de vida saudáveis, ou encaminhar ao médico para a reavaliação da medicação, ou instauração da mesma.

2.10.4 Antropometria

A Farmácia Sant'Ana dispunha de um aparelho de medição automática de peso e altura, calculando automaticamente o Índice de Massa Corporal (IMC). Se o utente desejasse, também é possível realizar as medidas do perímetro da anca e perímetro abdominal.

2.10.5 Consultas de nutrição

Estão ao dispor dos utentes da farmácia Sant'Ana consultas de nutrição, realizadas por uma técnica de Nutrição. As consultas são realizadas com total privacidade para o doente, e são realizados testes de antropometria para além do aconselhamento de uma dieta adequada a cada situação. É também, quando solicitada, realizado o aconselhamento de nutracêuticos ou outros suplementos alimentares adequados para cada situação ou caso concreto, minimizando assim os riscos para o utente ao serem aconselhados por um profissional conhecedor das intenções e estado de saúde do mesmo.

2.10.6 Administração de vacinas

Se assim solicitado pelo utente, podem ser-lhe administradas vacinas fora do âmbito do protocolo/calendário nacional de vacinação. A administração de vacinas apenas pode ser

efectuada por pessoal especializado e competente para tal operação, como é o caso de farmacêuticos com o curso em vacinação e injectáveis devidamente creditado, ou por enfermeiros.

2.11 Preparação de medicamentos

2.11.1 Matérias-primas

Toda a preparação de medicamentos manipulados encontra-se legislada, a começar pelas matérias-primas. A Lei consagra que não podem ser prescritos medicamentos manipulados que incluam matérias-primas diferentes das permitidas (as inscritas na Farmacopeia Portuguesa, na Farmacopeia Europeia e nas farmacopeias de outros Estados partes na Convenção relativa à Elaboração de uma Farmacopeia Europeia), ou qualquer das matérias-primas proibidas definidas na Deliberação nº 1498/2004, de 7 de Dezembro, do INFARMED (sobre o artigo 6º do Decreto-Lei nº 95/2004, de 22 de Abril).

O tipo de matérias-primas presentes na farmácia vai depender muito do tipo de preparações mais demandadas pelos clientes da mesma, e é necessário proceder a vários cuidados na sua recepção e armazenamento.

Começando pela recepção das matérias-primas, é necessário verificar os seguintes pontos:

- Verificar se o material recebido corresponde ao tipo e quantidade encomendada
- Verificar a integridade e condições de higiene do material encomendado
- Verificar a existência do boletim de análise com referência ao lote e fornecedor para embalagem primária, e se nele estão os resultados dos ensaios e se estes cumprem com as especificações
- Verificar se o boletim de análise corresponde à matéria-prima recebida, e se for a primeira vez que se recebe uma substância perigosa, é necessário verificar se o fornecedor disponibilizou a ficha com os dados de segurança em língua Portuguesa.
- Verificar se foi entregue pelo fornecedor em conformidade com exigências de conservação descritas para a mesma (condições de luz, temperatura, etc.)
- Se for necessário rejeitar a matéria-prima, devem-se devolver os recipientes ao fornecedor.
- No rótulo das matérias-primas deve constar:
 - Denominação farmacopeica da matéria-prima
 - Identificação do fornecedor
 - Nº lote
 - Condições de conservação
 - Precauções de manuseamento
 - Prazo de validade
 - Quantidade

Deve-se de seguida proceder ao armazenamento do recipiente. Os que caduquem primeiro devem ser usados primeiro, logo, colocados mais à frente no armário (*first expires, first out*), e se tiver o mesmo prazo de validade que o já existente, a lógica de uso e armazenagem é a mesma (*first in, first out*). Os reagentes devem ser separados em função do grau de perigo,

quantidades totais armazenadas e tamanho dos recipientes. Deve-se também tentar possuir o mínimo de substâncias perigosas possível. As substâncias em estado líquido devem ser armazenadas em prateleiras inferiores, e as incompatíveis não devem ser armazenadas lado a lado. Por fim, são realizadas inspeções periódicas mensais, analisando a caducidade e integridade das matérias-primas, e respectiva eliminação em segurança, caso seja necessário.

Para cada matéria-prima é preenchida uma Ficha de Matéria-prima, a qual é arquivada em *dossier* próprio, localizado no laboratório de farmacotecnia da farmácia. Deve constar na ficha as seguintes informações:

- Denominação da matéria-prima
- Outras denominações da matéria-prima
- N° de código atribuído internamente e localização no armazém
- Identificação do fornecedor e origem do mesmo
- N° e data da factura correspondente à aquisição
- Data da recepção
- N° de lote
- Quantidade recebida
- Prazo de validade
- N° de recipientes correspondentes à quantidade recebida
- N° do boletim de análise correspondente, que será anexado à respectiva ficha

Todos os registos das matérias-primas devem ser arquivados durante 1 ano em arquivo activo, e durante 3 anos em arquivo semi-activo.

2.11.2 Material de laboratório

De acordo com a Portaria n° 594/2004, de 2 de Junho, Boas Práticas a observar na preparação de manipulados, é estipulada a seguinte lista de material de laboratório obrigatório:

- Matrizes de várias capacidades
- Alcoómetro
- Papel de filtro
- Almofariz de vidro e almofariz de porcelana
- Papel indicador de pH universal
- Balança de precisão sensível ao mg
- Pedra para a preparação de pomadas
- Banho de água termostaticado
- Pipetas graduadas de várias capacidades
- Cápsulas de porcelana
- Provetas graduadas de várias capacidades
- Copos de várias capacidades

- Tamises FVII, com abertura de malha 180mcm e 355mcm (com fundo e tampa)
- Espátulas metálicas e não metálicas
- Termómetros (escala mínima até 100°C)
- Funis de vidro
- Vidros de relógio

2.11.3 Preparações magistrais e oficinais e Controlo de qualidade

Nas farmácias são normalmente realizados procedimentos operativos de modo a preparar formas farmacêuticas *não estéreis*. Alguns pontos fulcrais dos cuidados necessários na preparação destes medicamentos manipulados encontram-se detalhadamente descritos por lei, mediante a Portaria n° 594/04.

O ciclo da preparação dos manipulados inicia-se pela presença da receita médica que irá determinar a preparação e dispensa do medicamento pelo farmacêutico ou técnico de diagnóstico e terapêutica devidamente formado e com experiência para a preparação destes medicamentos. O farmacêutico, mediante a análise da prescrição, procura em bibliografia específica definida por lei, a fórmula para a preparação do manipulado: Nos termos do Decreto-Lei n° 90/2004, de 20 de Abril, é aceite para a preparação de *preparados oficinais* “qualquer farmacopeia ou formulário reconhecido em Portugal, nele se incluindo as farmacopeias e formulários oficiais aprovados legalmente ou reconhecidos pelo INFARMED”. Na Deliberação n° 1504/2004, de 7 de Dezembro, o INFARMED vem reconhecer:

- Formulários oficiais dos Estados membros da União Europeia
- *United States Pharmacopoea/National Formulary*
- Formulário Galénico Português: CETMED, ANF (edição iniciada em 2001)

Seguidamente dá-se início à preparação do manipulado, na qual se deve ter em atenção os seguintes pontos:

- A área de preparação deve estar devidamente limpa, mediante normas específicas que existem para a limpeza do laboratório
- As condições ambientais devem estar adequadas
- Todas as matérias-primas devem estar rotuladas com o prazo em vigor e os equipamentos necessários limpos
- O farmacêutico deve ter consigo os documentos necessários à correcta preparação, o material de embalagem passado por água purificada, e deve usar os produtos que caduquem em primeiro lugar.

Segundo a Portaria nº 594/04, deve-se preparar uma ficha de preparação de manipulados, em que conste:

- Nº de registo interno sequencial que identifiquem a ordem de preparação e ano
- Data de preparação
- Designação atribuída à preparação com indicação da concentração, se aplicável
- Quantidade a preparar
- Identificação alfanumérica do lote
- Fórmula: todas as matérias-primas a usar, quantidades para 100ml ou 100g
- Material e equipamento
- Técnica de preparação
- Ensaio de verificação
- Material de embalagem com indicação do nº de lote e origem
- Modelo de rótulo
- Prazo de utilização e condições de conservação
- Bibliografia

O farmacêutico ou o técnico que prepare o manipulado, deve rubricar cada passo da preparação do manipulado, e posteriormente, todo o processo é validado por rubrica do farmacêutico responsável, na mesma ficha de preparação de manipulados. Valida as matérias-primas, excipientes e quantidades, os ensaios de verificação do medicamento e a preparação final.

O operador deve também rubricar os pontos de limpeza do laboratório e material e equipamento, e a pesagem deve ser supervisionada por outro farmacêutico, segundo a Portaria nº 595/04. É ainda obrigatória a realização do ensaio das características organolépticas.

Todos os registos dos procedimentos operativos devem ser arquivados durante 1 ano em arquivo activo, e durante 3 anos em arquivo semi-activo.

2.11.4 Preço dos medicamentos preparados

O cálculo do PVP foi efectuado segundo o regime de preços de venda ao público dos medicamentos manipulados (Portaria nº 769/2004, de 1 de Julho):

- *Valor das matérias-primas*

[(preço de x comprimidos de INDERAL (propranolol) s/IVA)+(preço de x ml de xarope de sacarose s/IVA) + (outras matérias primas)]

- *Valor dos honorários*

O cálculo dos honorários da preparação tem por base um factor (F), cujo valor é actualizado anualmente e divulgado pelo INE (Instituto Nacional de Estatística). Os

honorários são ainda calculados consoante as formas farmacêuticas e as quantidades preparadas.

- *Valor dos materiais de embalagem*

São determinados pelo valor de aquisição (s/IVA) multiplicado por 1,2.

O PVP resulta da aplicação da fórmula:

(Valor das matérias-primas+Valor dos honorários+Valor dos materiais de embalagem) x 1,3
acrescido do valor de IVA (neste caso, 6%).

2.11.5 Rotulagem e Validade

No final da preparação do manipulado, e depois do mesmo ser acondicionado no recipiente próprio, é necessário proceder ao preenchimento do rótulo identificativo que será colado no recipiente. No mesmo devem constar:

- Identificação da farmácia, director técnico e contacto
- Forma farmacêutica
- Nome genérico
- Dosagem
- Composição
- Quantidade
- Volume de administração
- Data de preparação
- Prazo de validade
- Condições de conservação
- N° de lote
- Precauções e cuidados

Dependendo da preparação, estão descritas normas para atribuição de prazos de utilização, nunca excedendo o prazo de validade de cada matéria prima. Caso não haja estudos prévios de estabilidade aplicam-se as regras gerais de atribuição de prazos de utilização.

2.11.6 Várias preparações

Durante o estágio na farmácia Sant'Ana, assisti e preparei diversos manipulados: a preparação de um xarope de Propanolol e de diversas preparações extemporâneas.

2.11.6.1 Preparações extemporâneas de especialidades farmacêuticas

É extremamente comum a preparação extemporânea de especialidades farmacêuticas na farmácia Sant'Ana, em especial de antibióticos para administração pediátrica. Estes medicamentos encontram-se normalmente em forma de pós liofilizados para posterior

reconstituição com água purificada. É necessário observar correctamente os rótulos para identificar a quantidade de água a ser adicionada. Alguns medicamentos não referem a quantidade de água a adicionar, pelo contrário o rótulo possui uma marca, e a suspensão ou solução de xarope deverá atingir a marca referida, pelo que a água deverá ser adicionada com cuidado para no final se atingir a concentração de antibiótico correcta. Este tipo de reconstituições, por norma, passam a ter uma validade de 15 dias, e necessitam ser refrigeradas. Temos que instruir o doente acerca destas indicações, e também para ter o cuidado de agitar antes de usar, caso se trate de uma suspensão, que é o caso da maioria destas preparações.

2.11.6.2 Preparação do xarope de Propanolol

Esta é a preparação mais realizada na farmácia para um utente específico de cerca de 2 anos de idade. A inexistência de uma preparação farmacêutica de propanolol com a dosagem adequada deste princípio activo para a população pediátrica torna necessária a manipulação das formas farmacêuticas avaliáveis numa forma farmacêutica e dosagem adequada para esta criança. A preparação envolve os passos e cuidados referidos no ponto anterior. Durante a preparação tive de garantir as condições de higiene necessárias, de modo a evitar a contaminação do xarope. Não se trabalha em condições assépticas, mas quanto possível tenta-se evitar ou minimizar a contaminação do xarope mantendo o ambiente limpo: assim, o operador trabalha sempre com luvas, touca e máscara. Todo o material já limpo é passado por água purificada, para garantir que possui o menor nível de partículas ou outros contaminantes. Por vezes é passado por álcool o material, que garante a esterilidade do mesmo: no meu caso, como a preparação se destinava a uma criança de 2 anos, que possui defesas imunitárias mais debilitadas, passei por álcool o material que usei na preparação, deixando secar completamente antes de o usar. Tive de rubricar cada passo na ficha de preparação de manipulados, e sob validação do farmacêutico responsável.

2.12 Contabilidade e Gestão da farmácia

2.12.1 Colaboradores da Farmácia

A cada trabalhador da farmácia é-lhe atribuída uma função, pela qual deve zelar e cumprir prioritariamente. A atribuição dessas funções pela diretora técnica baseou-se nas suas experiências e capacidades de executar com maior afinidade tais tarefas, mas, principalmente, de acordo com a categoria profissional de cada um. A todos é permitida a realização do atendimento, desde que supervisionado por qualquer farmacêutico. Há uma farmacêutica responsável pela validação e correção de todo o receituário e responsável pelo Laboratório, outra farmacêutica responsável pela correção dos prazos de validade ao início de cada mês e pela devolução das embalagens cujo prazo de validade se encontra a expirar, outro farmacêutico responsável pela visualização e interpretação de dados informáticos, como sejam as temperaturas do frigorífico, bem como responsável pelo Gabinete de Atendimento Personalizado, uma técnica auxiliar responsável pela organização do armazém e reposição de *stocks*, uma técnica auxiliar responsável pela contagem física, e o técnico de farmácia responsável pelo registo e equipamentos. A função das compras está delegada, no caso da farmácia onde estagiei, à diretora técnica, que também tem função de revisão do receituário. A atribuição de funções específicas a cada trabalhador na farmácia facilita a coordenação entre todos, e tal repercute-se num melhor funcionamento da farmácia e consequente atendimento ao público.

A formação contínua deve ser uma preocupação patente na postura de toda a equipa, e cada vez mais é necessária uma cultura de aprendizagem que permita o aperfeiçoamento profissional nas suas diversas vertentes (técnico, científico, ético e legal). São obrigatórias a realização de 35h de formação anual.

2.12.2 Faturação e Receituário

No final de cada mês são fechados todos os lotes de receitas de todos os regimes de comparticipação das receitas aviadas nas farmácias. Cada lote tem 30 receitas, logo, estas são numeradas de 1 a 30. Cada organismo possui os seus lotes, ou seja, é impossível uma receita normal do Sistema Nacional de Saúde (01) cair num lote de Pensionistas (48). Aquando da cedência de medicamentos comparticipados, o sistema informático emite, mediante o organismo responsável pela comparticipação, um documento de faturação que é impresso da parte de trás da receita médica. É atribuída a cada receita a identificação do lote a que pertence (número e série) e a numeração é sequencial. A composição do documento de faturação encontra-se presente no Anexo V:

Todas as receitas são conferidas pelos colaboradores da farmácia no próprio dia da dispensa, com especial incidência aos seguintes pontos: medicamentos dispensados foram os mesmos que estavam prescritos (há as tais exceções, para as embalagens redimensionadas, cedência de outro medicamento genérico do mesmo grupo homogéneo...), se a receita se encontra dentro do prazo de validade, se tem a assinatura do médico prescritor, se foi faturada no

organismo correto... Caso algum ponto falhe, é necessário corrigi-lo, se possível. Após a revisão das receitas, estas são carimbadas, colocada a data e assinadas pela farmacêutica responsável pela revisão. Posteriormente são organizadas por lotes e número e a cada lote completo é impresso um verbete, que possui as seguintes informações acerca do lote:

- Entidade: organismo - código informático, nome e sigla;
- Nome da Farmácia, respetivo código ANF e carimbo;
- Mês e ano;
- Código tipo e número sequencial do lote;
- Quantidade de receitas e produtos;
- Valor total do lote correspondente a PVP, preço a pagar pelos utentes e participação do organismo.

É então emitida a Relação resumos dos lotes para cada um dos organismos, que tem informações sobre todos os lotes que lhe pertencem. É emitida em quadruplicado, carimbada e rubricada.

Emite-se ainda um outro documento: a Fatura Mensal de Medicamentos, em quadruplicado. A composição da fatura mensal de medicamentos é igual à do documento de faturação, cuja composição se encontra presente no anexo IV.

Os lotes receitas e documentação relativos ao SNS têm de ser enviados até ao dia 5 de cada mês ao Centro de Conferência de Faturas.

Os lotes referentes a outras entidades, juntamente com os verbetes, relação resumos de lotes e faturas são enviados à ANF, que posteriormente os remete para cada uma das entidades responsáveis (ex: EDP, Caixa, Sindicato dos Bancários...). Cada organismo paga à ANF, que paga depois às farmácias, funcionando assim como intermediário entre as farmácias e os organismos com os quais estabeleceu acordos.

Sempre que no decurso da conferência das receitas sejam detetadas falhas no cumprimento das exigências estabelecidas pelos organismos participantes, imputáveis à Farmácia, o Serviço de Conferência de Faturas devolverá à Farmácia a(s) receita(s) em situação irregular, acompanhada(s) da justificação da sua devolução. Nesta situação, o organismo em causa não paga o respetivo valor de participação. No entanto, uma vez regularizada a situação, a(s) receita(s) pode(m) se incluída(s) no receituário do mês seguinte, assegurando, assim, a receção do montante relativo à participação.

2.12.3 Documentos contabilísticos

Existem diversos documentos contabilísticos essenciais na farmácia:

Guia de remessa é o documento que acompanha a documentação da carga a ser enviado para o destinatário. Nela são relacionados todos os documentos relacionados à carga a ser transportada. É muitas vezes semelhante a uma fatura, e é o tipo de documento geralmente

entregue pelos laboratórios de distribuição a acompanhar as encomendas. Não possui valor para a realização de faturação.

Fatura: É um documento comercial que representa a venda para clientes domiciliados em território nacional. Possui uma listagem dos produtos comprados e enviados pelo vendedor, especificando a quantidade de cada um bem como o preço de fatura e o preço de venda ao público quando existente.

Recibo: Papel emitido tem como objetivo comprovar algum pagamento efetuado.

Nota de devolução: papel que deve acompanhar o produto a devolver com as características do produto e a razão da devolução. Deve ser enviada ainda uma cópia da nota de devolução para o caso de ocorrer uma inspeção.

Nota de crédito: é um documento comercial emitido por um vendedor a um comprador. Ela indica quantidades, preços e formas de pagamento acordados entre vendedor e o comprador para produtos cujo comprador não pagou, não recebeu, ou devolveu. Pode também ser emitida no caso de mercadorias danificadas, erros ou reajustes. Uma Nota de Crédito pode reduzir ou eliminar o montante que o comprador tem de pagar ao vendedor, em relação ao original da fatura emitida anteriormente. A Nota de Crédito geralmente contém: Código, Data, Endereço de facturamento, Endereço de Entrega, Condições de Pagamento, Lista de Produtos com preços e quantidades. Normalmente ela também referências a fatura original e pode estar especificada a razão de sua emissão.

O vendedor geralmente emite uma Nota de Crédito para igual ou menor valor do que a fatura original, em seguida, reembolsa o dinheiro ao comprador ou abate este Crédito de um saldo devedor de outras possíveis transações do mesmo comprador. Há casos em que o dinheiro não é devolvido, ficando o comprador com “Crédito” com o Vendedor para futuras compras.

Inventário: contagem dos bens disponíveis em stock para venda.

Balancete: O Balancete de Verificação é uma técnica bastante utilizada pelos responsáveis pela contabilidade para verificar se os lançamentos contábeis realizados no período estão corretos. O Balancete de Verificação tem como base o método das partidas dobradas: não há crédito sem débito correspondente. Portanto se de um lado for somado todos os débitos, do outro a soma dos créditos tem que somar um valor igual. Desse modo é verificado se os lançamentos a débito e a crédito foram realizados corretamente.

A contabilidade deve conter sempre os documentos originais, e devem ser guardados durante 3 anos todos os documentos contabilísticos na farmácia.

2.12.4 Obrigações fiscais, preços e princípios gerais que os regem

Segundo o Decreto-Lei n.º 112/2011, de 29 de Novembro entende(m)-se por:

- a) «Preço de venda ao armazenista» (PVA) o preço máximo para os medicamentos no estágio de produção ou importação;
- b) «Preço de venda ao público» (PVP) o preço máximo para os medicamentos no estágio de retalho;
- c) «Preços fixados com carácter provisório» os preços que não foram determinados com base no preço do mesmo medicamento ou, caso este não exista, das especialidades farmacêuticas idênticas ou essencialmente similares de pelo menos dois dos três países de referência mencionados no n.º 2 do artigo 6.º;
- d) «Regime de preço máximo» a fixação do seu valor na venda ao público, o qual não pode ser ultrapassado;
- e) «Preço de referência» o valor sobre o qual incide a comparticipação do Estado no preço dos medicamentos incluídos em cada um dos grupos homogéneos, de acordo com o escalão ou regime de comparticipação que lhes é aplicável; («Grupo homogéneo» é conjunto de medicamentos com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias activas, dosagem e via de administração, com a mesma forma farmacêutica ou com formas farmacêuticas equivalentes, no qual se inclua pelo menos um medicamento genérico existente no mercado, podendo ainda integrar o mesmo grupo homogéneo os medicamentos que, embora não cumprindo aqueles critérios, integrem o mesmo grupo, ou subgrupo, farmacoterapêutico e sejam considerados equivalentes terapêuticos dos demais medicamentos que daquele grupo fazem parte)

A farmácia possui a obrigação fiscal de pagar todos os meses ou de três em três meses ao longo do ano o IVA. Depende do valor das compras e vendas, de cada mês e não do inventário. Existem 2 tipos de IVA numa farmácia:

IVA a 6% - Medicamentos e outros produtos

IVA a 23% - outros produtos como alguns suplementos alimentares, dermocosméticas...

O IRS é o imposto de Rendimento de pessoas Singulares. Todos os produtos de 5% de IVA entram para as despesas de IRS, enquanto os produtos a 21% só entram quando acompanhados de receita médica.

O IRC é o imposto de Rendimento de pessoas Coletivas e é calculado com base no rendimento gerado pela farmácia no ano.

2.13 Conclusão

A farmácia comunitária é, indubitavelmente, um local rico em conhecimentos científicos e de saúde e um local de transmissão contínua de cuidados, onde encontramos um universo imenso de medicamentos e outros produtos. A minha experiência pessoal na área da farmácia comunitária foi muito positiva, tendo apreciado bastante o meu primeiro contacto com a profissão futura.

O contacto com o utente é uma das mais privilegiadas ações do farmacêutico, que requerem extrema atenção e responsabilidade, mas além desta privilegiada função farmacêutica, este profissional de saúde pode atuar noutras áreas fundamentais à prestação de cuidados de saúde dentro da Farmácia de Oficina.

Nestas horas e dias de estágio o conhecimento adquirido foi muito, mas ressalvo que o tempo também é curto para conhecer em mais pormenor tamanha complexidade que constitui o domínio da Farmácia Comunitária. Não obstante, após realizado o estágio, sinto-me uma futura farmacêutica capaz de integrar com sucesso o hoje escasso, e esperemos que futuramente abundante, mercado de trabalho nesta área tão privilegiada.

2.14 Bibliografia

- [1] ANF - www.anf.pt - acedido a 6/6/2012
- [2] INFARMED - www.infarmed.pt - acedido a 10/5/2012
- [3] Ministério da Agricultura - www.gpp.pt/RegAlimentar/Alim_especial/index.html - acedido a 13/5/2012
- [4] Direção Geral de Saúde - www.dgs.pt - acedido a 13/5/2012
- [5] Mesquita, A. (2000), Direito Farmacêutico - Anotado, 3ª Edição. Lisboa: Publicações Farmácia Portuguesa;
- [6] Formulário Galénico Português
- [7] Material cedido pela Farmácia Sant'Ana
- [8] Decreto-Lei n.º 176/2006, de 30 de Agosto - Estatuto do Medicamento
- [9] Portaria n.º 348/98, de 15 de Junho - Boas práticas de distribuição de medicamentos de uso humano e medicamentos veterinários
- [10] Revista Factores de Risco, Nº24 JAN-MAR 2012 - <http://www.spc.pt/DL/RFR/artigos/393.pdf>

ANEXO I

Cálculo de margens regressivas

Para medicamentos comparticipados e não comparticipados, segundo o Decreto-Lei nº 112/2011, existem margens regressivas em relação ao PVA, sendo estas:

- ✓ PVA até 5€
 - 27,9%, calculada sobre o PVA
- ✓ PVA entre 5.01€ e 7€
 - 25,7%, calculada sobre o PVA, acrescido de 0.11€
- ✓ PVA entre 7.01€ e 10€
 - 24,4 %, calculada sobre o PVA, acrescido de € 0,20;
- ✓ PVA entre € 10,01 e € 20
 - 21,9 %, calculada sobre o PVA, acrescido de € 0,45
- ✓ 21,9 %, calculada sobre o PVA, acrescido de € 0,45
 - 18,4 %, calculada sobre o PVA, acrescido de € 1,15
- ✓ PVA acima de € 50
 - € 10,35

ANEXO II

Lista de situações passíveis de automedicação

- ✓ Diarreia.
- ✓ Hemorróidas (diagnóstico confirmado).
- ✓ Pirose, enfartamento, flatulência.
- ✓ Obstipação.
- ✓ Vômitos, enjoo do movimento.
- ✓ Higiene oral e da orofaringe.
- ✓ Endoparasitoses intestinais.
- ✓ Estomatites (excluindo graves) e gengivites.
- ✓ Odontalgias.
- ✓ Profilaxia da cárie dentária.
- ✓ Candidíase oral recorrente com diagnóstico médico prévio.
- ✓ Modificação dos termos de higiene oral por desinfecção oral.
- ✓ Estomatite aftosa.
- ✓ Sintomatologia associada a estados gripais e constipações.
- ✓ Odinofagia, faringite (excluindo amigdalite).
- ✓ Rinorreia e congestão nasal.
- ✓ Tosse e rouquidão.
- ✓ Tratamento sintomático da rinite alérgica perene ou sazonal com diagnóstico médico prévio.
- ✓ Adjuvante mucolítico do tratamento antibacteriano das infecções respiratórias em presença de hipersecreção brônquica
- ✓ Prevenção e tratamento da rinite alérgica perene ou sazonal com diagnóstico médico prévio (corticóide em inalador nasal) .
- ✓ Queimaduras de 1º grau, incluindo solares.
- ✓ Verrugas.
- ✓ Acne ligeiro a moderado.
- ✓ Desinfecção e higiene da pele e mucosas
- ✓ Micoses interdigitais.
- ✓ Ectoparasitoses.
- ✓ Picadas de insectos.
- ✓ Pitiríase capitis (caspa).
- ✓ Herpes labial.
- ✓ Feridas superficiais.
- ✓ Dermatite das fraldas.
- ✓ Seborreia.
- ✓ Alopecia.
- ✓ Calos e calosidades.
- ✓ Frieiras.
- ✓ Tratamento da pitiríase versicolor.
- ✓ Candidíase balânica.
- ✓ Anestesia tópica em mucosas e pele nomeadamente mucosa oral e rectal.

- ✓ Tratamento sintomático localizado de eczema e dermatite com diagnóstico médico prévio.
- ✓ Cefaleias ligeiras a moderadas.
- ✓ Tratamento da dependência da nicotina para alívio dos sintomas de privação desta substância em pessoas que desejem deixar de fumar.
- ✓ Enxaqueca com diagnóstico médico prévio.
- ✓ Ansiedade ligeira temporária.
- ✓ Dificuldade temporária em adormecer.
- ✓ Dores musculares ligeiras a moderadas.
- ✓ Contusões.
- ✓ Dores pós-traumáticas.
- ✓ Dores reumáticas ligeiras a moderadas (osteoartrose/osteoartrite).
- ✓ Dores articulares ligeiras a moderadas.
- ✓ Tratamento tópico de sinovites, artrites (não infecciosa), bursites, tendinites.
- ✓ Inflamação moderada de origem músculo-esquelética nomeadamente pós-traumática ou de origem reumática.
- ✓ Febre (menos de três dias).
- ✓ Estados de astenia de causa identificada.
- ✓ Prevenção de avitaminoses.
- ✓ Hipossecreção conjuntival, irritação ocular de duração inferior a três dias.
- ✓ Tratamento preventivo da conjuntivite alérgica perene ou sazonal com diagnóstico médico prévio.
- ✓ Tratamento sintomático da conjuntivite alérgica perene ou sazonal com diagnóstico médico prévio.
- ✓ Dismenorreia primária.
- ✓ Contraceção de emergência.
- ✓ Métodos contraceptivos de barreira e químicos.
- ✓ Higiene vaginal.
- ✓ Modificação dos termos de higiene vaginal por desinfecção vaginal.
- ✓ Candidíase vaginal recorrente com diagnóstico médico prévio. Situação clínica caracterizada por corrimento vaginal esbranquiçado, acompanhado de prurido vaginal e habitualmente com exarcebação pré-menstrual.
- ✓ Terapêutica tópica nas alterações tróficas do tracto génito-urinário inferior acompanhadas de queixas vaginais como disparêunia, secura e prurido.
- ✓ Síndrome varicosa – terapêutica tópica adjuvante.
- ✓ Tratamento sintomático por via oral da insuficiência venosa crónica (com descrição de sintomatologia).

ANEXO III

Lista de produtos dietéticos com caráter terapêutico destinados aos doentes afetados de erros congênitos do metabolismo

- Add Ins
- Anamix Júnior Drink frutos silvestres
- Anamix Júnior Drink laranja
- Colesterol module
- DHA Basic
- Easiphen Frutos Silvestres
- Easiphen Toranja
- Energivit
- Fantomalt
- Fleet PKU 1 (FM06/2009)
- Fleet PKU Avant Monodoses (11FM76GPP1)
- Fleet PKU Avant 500 g
- Fleet PKU Gel (FM09/2009)
- Fleet PKU Gold (FM10/2009)
- Fleet PKU Plus monodoses (11FM78GPP1)
- Fleet PKU Plus 500 g
- Fleet PKU Star monodoses (11FM77GPP1)
- Fleet PKU Star 500 g
- GA 1
- GA 2 - prima
- HOM 1
- HOM 2
- KcaLIP (11FM047GPP1)
- Ketocal baunilha
- Ketocal neutron
- L-Arginina
- L-Cistina
- LEU 1
- LEU 2
- L-Fenilalanina
- L-Glicina
- L-Isoleucina
- L-Prolina
- L-Valina

- LYS 1
- LYS 2
- MCT OIL Module
- Monogen
- MSUD Anamix Júnior LQ laranja (FM3212009)
- MSUD 1
- MSUD 2
- NeoPhe pó (10FM37GPP1)
- NeoPhe tabletes (10FM36GPP1)
- OS 1
- OS 2
- PFD 1
- PhenylAde 40
- PhenylAde barras proteicas
- PhenylAde Baunilha
- PhenylAde Integral
- PhenylAde Morango
- Phenyl-Free 1
- Phlexy - 10 Bars Limão
- Phlexy - 10 Capsules
- Phlexy - 10 Drink Mix Tropical
- Phlexy -10 Drink Mix Limão
- Phlexy -10 Drink Mix Maça
- Phlexy 10 drink mix maçã
- Phlexy 10 drink mix tropical
- Phlexy -10 tablets
- PKU Anamix Júnior Ananás e Baunilha
- PKU Anamix Junior Neutro
- PKU Cooler 10 framboesa (FM72/2009)
- PKU Cooler 15 framboesa (FM73/2009)
- PKU Cooler 20 framboesa (FM74/2009)
- PKU Lophlex LQ 10 Frutos Silvestres (FM3312009)
- PKU Lophlex LO 10 Laranja (FM3412009)
- PKU Lophelex LQ 10 Limão (FM35/2009)
- PKU Lophelex LQ 10 Frutos Tropicais (FM36/2009)
- PKU Lophlex LQ 20 Laranja (FM3712009)
- PKU Lophelex LO 20 Limão (FM38/2009)
- PKU Lophelex LQ 20 Frutos Tropicais (FM39/2009)
- PKU Lophlex LQ 20 Frutos Silvestres
- PKU 1

- PKU 2
- PKU 2 prima
- PKU 2 secunda
- PKU 2 Shake chocolate - caramelo
- PKU 2 Shake morango - baunilha
- PKU 3
- PKU 3 advanta
- PKU 3 tablets
- PKU Express pó laranja
- PKU Express pó limão
- PKU Express pó neutron
- PKU Express pó tropical
- PKU gel neutron
- Prosobee
- Resource aceite MCT
- Resource Dextrine Maltose
- TYR 1
- TYR 2
- TYR Anamix Júnior
- UCD 1
- UCD 2
- Visoy
- Vitaflo Docómega (10FM014GPP1)
- Vitaflo EAA Supplement
- Vitaflo GA/Gel
- Vitaflo HCU Cooler
- Vitaflo HCU Express pó
- Vitaflo HCU Gel
- Vitaflo KeyOmega (FM75/2009)
- Vitaflo MMA/PA Express pó
- Vitaflo MMA/PA Gel
- Vitaflo MSUD Cooler Laranja
- Vitaflo MSUD Express Neutro
- Vitaflo MSUD Gel Neutro
- Vitaflo PKU Cooler 10 Neutro
- Vitaflo PKU Cooler 15 Neutro
- Vitaflo PKU Cooler 20 Neutro
- Vitaflo PKU Express Cooler 10 laranja
- Vitaflo PKU Express Cooler 10 purpura
- Vitaflo PKU Express Cooler 15 laranja

- Vitaflo PKU Express Cooler 15 purpura
- Vitaflo PKU Express Cooler 20 laranja
- Vitaflo PKU Express Cooler 20 purpura
- Vitaflo TYR Cooler
- Vitaflo TYR Express pó
- Vitaflo TYR Gel
- XP Analog LCP
- XP Maxamum Laranja
- XP Maxamum Neutro

ANEXO IV

Dispositivos médicos

Dispositivos Médicos da Classe I:

- Dispositivos destinados à recolha de fluídos corporais, como por exemplo:
 - sacos colectores de urina
 - sacos para ostomia
 - fraldas e pensos para incontinência.
- Dispositivos destinados à imobilização de partes do corpo e/ou aplicar força ou compressão, como por exemplo:
 - colares cervicais
 - meias de compressão
 - pulsos, meias, joelheiras elásticos para fins médicos.
- Dispositivos utilizados para suporte externo do paciente:
 - auxiliares de marcha, cadeiras de rodas
 - canadianas, muletas
 - camas de hospital
- Dispositivos não invasivos
 - Estetoscópio,
 - Pensos oculares,
 - Óculos correctivos, armações.
- Dispositivos destinados a conteúdos temporários ou com função de armazenamento
 - Seringas sem agulha
 - Taças e colheres especificamente destinadas à administração de medicamentos
- Dispositivos invasivos de orifícios do corpo de utilização temporária, como por exemplo:
 - espelhos de mão usados em medicina dentária como auxiliar de diagnóstico
 - luvas de exame
 - irrigadores
- Dispositivos invasivos utilizados na cavidade oral até à faringe, no canal auditivo até ao tímpano ou na cavidade nasal, como por exemplo:
 - Material de penso para hemorragias nasais
 - dentaduras removíveis
 - soluções para irrigação ou lavagem mecânica
- Dispositivos não invasivos que contactam com a pele lesada e que são utilizados como barreira mecânica, para compressão ou absorção de exsudados, como por exemplo:
 - Algodão hidrófilo
 - ligaduras

Dispositivos Médicos da Classe IIa:

- Dispositivos que se destinam a controlar o micro ambiente de uma ferida:
 - Compressas de gaze hidrófila esterilizadas ou não esterilizadas
 - pensos de gaze não impregnados com medicamentos
 - material de penso à base de filmes poliméricos
 - adesivos oclusivos para uso tópico
- Dispositivos invasivos de orifícios do corpo, para utilização a curto prazo:
 - Lentes de contacto com fins correctivos
 - cateteres urinários
 - pessários vaginais/uretrais
- Dispositivos activos com função de medição, como por exemplo:
 - Termómetro c/ pilha ou outra fonte de energia associada
 - medidores de tensão com fonte de energia associada
- Dispositivos invasivos de orifícios do corpo, que se destinam a ser ligados a um dispositivo médico activo:
 - Permutadores de calor e humidade
 - irrigadores nasais equipados com motor
- Dispositivos invasivos de carácter cirúrgico, destinados a utilização temporária:
 - agulhas das seringas
 - lancetas
 - luvas cirúrgicas
- Dispositivos activos:
 - Aparelho auditivos
- Dispositivos destinados especificamente a serem utilizados na desinfeção de dispositivos médicos

Dispositivos Médicos da Classe IIb:

- Dispositivos que se destinam a ser utilizados principalmente em feridas que tenham fissurado a derme de forma substancial e extensa e onde o processo de cicatrização só se consegue por intervenção secundária, como por exemplo:
 - Material de penso para feridas ulceradas extensas e crónicas.
 - Material de penso para queimaduras graves que atingem a derme e cobrem uma área extensa.
 - Material de penso para feridas de decúbito graves
- Dispositivos que se destinam à administração de medicamentos:
 - Canetas de insulina.
- Dispositivos utilizados na contracepção e/ou prevenção de doenças sexualmente transmissíveis:
 - Preservativos masculinos

- diafragmas.
- Dispositivos destinados especificamente a serem utilizados na desinfecção, limpeza, lavagem ou hidratação das lentes de contacto:
 - Soluções de conforto para portadores de lentes de contacto.

Dispositivos Médicos da Classe III:

- Dispositivos que incorporam uma substância medicamentosa e que constituem um único produto não reutilizável e em que a acção da substância é acessória à do dispositivo, como por exemplo:
 - preservativos com espermicida
 - pensos com medicamentos
- Dispositivos utilizados na contraceção implantáveis ou invasivos de utilização a longo prazo:
 - Dispositivo intra-uterinos, que não libertem progestagénios.

Dispositivos Médicos para Diagnóstico *In Vitro*:

- Dispositivos destinados a serem utilizados pelo leigo (para auto-diagnóstico), como por exemplo:
 - Teste de gravidez
 - equipamento para medição de glicémia
 - reagente tiras-teste para determinação da glicémia, glicosúria e cetonúria
 - Recipientes para colheita de amostras, esterilizados e não esterilizados:
 - Frasco para colheita de urina asséptica.
- Frasco para colheita de urina, expetoração, etc.

ANEXO V

Elementos que constantes no documento de faturação

- 1) Identificação da farmácia e código ANF; número da fatura;
- 2) Mês e ano;
- 3) Organismo e número de lotes;
- 4) Valor total de PVP;
- 5) Comparticipação dos utentes;
- 6) Comparticipação do Estado; faturação do receituário do Protocolo; data (último dia de cada mês);
- 7) Carimbo da Farmácia e assinatura do Diretor-Técnico ou legal substituto.