



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Maria de Fátima Pinto Branco de Brito

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Filipa Couto, da Dra. Dina Lopes e da Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da Silveira e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2020



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Maria de Fátima Pinto Branco de Brito

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?" referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Ana Filipa Couto, da Dra. Dina Lopes e da Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da Silveira apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2020

### **Declaração de Autoria**

Eu, Maria de Fátima Pinto Branco de Brito, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2015233270, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?" apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular. Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 9 de setembro de 2020.

Maria de Fátima Pinto Branco de Brito  
(Maria de Fátima Pinto Branco de Brito)

## **Agradecimentos**

Como na vida pessoal, académica ou profissional nada se consegue sozinho, é minha obrigação agradecer:

Aos meus pais e irmão, por sempre me terem apoiado incondicionalmente em todas as minhas decisões, por estarem lá nos momentos de festa, mas também nos de luta, pelo apoio e incentivo constantes.

Aos meus tios e padrinho, por me terem acolhido de braços abertos e fazerem-me sentir completamente em casa.

À minha família no geral, que me acompanhou durante toda esta caminhada, fonte de paciência e apoio inesgotável.

Ao Rodrigo, que, de tanto me ouvir, quase é também ele Mestre em Ciências Farmacêuticas. Acompanhou-me durante estes 5 anos, felicitou-me nos melhores momentos e alegrou-me nos piores, sempre com a sua paciência de santo.

Aos meus amigos de sempre, pois moldaram a pessoa que sou hoje. Cada um segue o seu percurso, mas quando é preciso, e quando não é também, as nossas rotas reúnem-se.

Às amigas que a universidade me ofereceu, que partilharam comigo o percurso académico e tudo o que lhe está inerente, que transitaram comigo da fase mais feliz das nossas vidas para aquela que será a mais desafiante. E sei que continuaremos juntas.

À Professora Doutora Maria Eduarda Silveira, pela disponibilidade total, por todo o empenho e dedicação e por me ter ensinado tanto.

A Coimbra, por ter sido o palco de toda esta caminhada.

Obrigada!

## ÍNDICE

### PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES DO MEDICAMENTO

Lista de Abreviaturas .....	8
Introdução .....	9
Contextualização .....	10
Análise SWOT .....	11
1. PONTOS FORTES .....	11
1.1. Colocação numa sala com colaboradores .....	11
1.2. Acesso a bases de dados e programas informáticos .....	11
1.3. Assuntos Regulamentares do Medicamento no prisma da Autoridade Competente.....	12
2. PONTOS FRACOS .....	12
2.1. Teletrabalho .....	12
2.2. Introdução teórica excessiva .....	12
2.3. Equipa reduzida .....	13
3. OPORTUNIDADES.....	13
3.1. Aperfeiçoar a Língua Inglesa.....	13
3.2. Erros comuns na submissão de pedidos de AIM.....	13
4. AMEAÇAS.....	14
4.1. Dificuldades na Língua Inglesa.....	14
4.2. COVID-19.....	14
Conclusão.....	15
Bibliografia .....	16

### PARTE II - RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Lista de Abreviaturas .....	18
Introdução .....	19
Contextualização .....	20
Análise SWOT .....	21
1. PONTOS FORTES .....	21
1.1. Bom ambiente no local de trabalho .....	21
1.2. Tarefas de <i>backoffice</i> diversificadas.....	21
1.3. Quadro KAIZEN .....	22
1.4. Cartão Saúde .....	22
1.5. Análise de produtos sem consumo .....	22
1.6. Serviços Farmacêuticos.....	23
2. PONTOS FRACOS .....	23
2.1. Equipa reduzida .....	23
2.2. Clientes homogéneos .....	23
3. OPORTUNIDADES.....	24
3.1. Formações externas.....	24
3.2. Duas estagiárias.....	24
4. AMEAÇAS.....	25
4.1. COVID-19.....	25

4.2. Fase de crescimento da Farmácia Gaspar .....	25
4.3. Produtos de Uso Veterinário.....	25
Casos Práticos.....	26
CASO I.....	26
CASO 2.....	26
Conclusão.....	27
Bibliografia .....	28
<b>PARTE III - MONOGRAFIA</b>	
Lista de Abreviaturas .....	30
Resumo .....	31
Abstract .....	32
Introdução.....	33
1. Biocidas.....	34
1.1. PERSPETIVA HISTÓRICA: DA ANTIGUIDADE AOS NOSSOS DIAS.....	34
1.2. A RAZÃO DO SEU RESSURGIMENTO .....	37
1.3. A SUA IMPORTÂNCIA NOS DIVERSOS SETORES DA ECONOMIA.....	37
1.4. CLASSES E MECANISMOS DE AÇÃO.....	38
2. Antibióticos .....	40
2.1. PERSPETIVA HISTÓRICA: DA ANTIGUIDADE AOS NOSSOS DIAS.....	40
I) A descoberta de novos compostos.....	42
II) Adaptação Bacteriana .....	44
2.2. CLASSES E MECANISMOS DE AÇÃO.....	44
3. Partilha de Mecanismos de Resistência entre Biocidas e Antibióticos.....	48
3.1. TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL DE GENES.....	52
I) Conjugação.....	52
II) Transdução.....	53
III) Transformação .....	53
3.2. ELEMENTOS GENÉTICOS MOVÉIS.....	53
4. Bactérias Pan-resistentes – a ameaça global do século XXI? .....	55
4.1 ATUALIDADE NACIONAL E INTERNACIONAL.....	55
4.2. PERSPETIVAS FUTURAS.....	58
Conclusão e Perspetivas Futuras.....	60
Bibliografia .....	61
Anexos .....	66
ANEXO I .....	66
ANEXO II .....	76
ANEXO III.....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS DA PARTE III

Figura 1: Consumo global de Biocidas, por regiões, na indústria de plásticos. ....	13
Figura 2: Cronologia da descoberta das diferentes classes de antibióticos.....	16
Figura 3: Alvos bacterianos de diferentes classes de antibióticos.....	20
Figura 4: Mecanismos de co-seleção de bactérias resistentes a biocidas e a antibióticos: resistência cruzada, co-resistência e co-regulação.....	25
Figura 5: Percentagem de ARGs e/ou BMRGs inscritos em genomas e plasmídeos. Perfil genotípico de resistência: a) 2522 genomas; b) 1926 plasmídeos que se encontram inscritos nos 2522 genomas descritos em a); c) 4582 plasmídeos; d) plasmídeos portadores de ARGs com ou sem BMRGs no mesmo plasmídeo; e) genomas portadores de ARGs com ou sem BMRGs no mesmo genoma.....	26
Figura 6: Dados comparativos entre Portugal e EU de níveis de resistência de estirpes MRSA à meticilina, <i>E. coli</i> às cefalosporinas de 3 <sup>a</sup> geração, <i>K. pneumoniae</i> aos carbapenemos e <i>E. faecium</i> à vancomicina.....	33

## ÍNDICE DE TABELAS DA PARTE III

Tabela 1: Dados cronológicos da descoberta ou utilização de biocidas ao longo da História. ....	11
Tabela 2: Classificação de biocidas segundo o mecanismo de ação no local alvo da célula bacteriana. ....	14
Tabela 3: Lista dos patogénios cujo desenvolvimento de novos antibióticos é prioritário, segundo a OMS.....	31

# **PARTE I**

## **RELATÓRIO DO ESTÁGIO EM ASSUNTOS REGULAMENTARES DO MEDICAMENTO**

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



## **LISTA DE ABREVIATURAS**

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

ARM – Assuntos Regulamentares do Medicamento

CTD – *Common Technical Document*

DAM – Direção de Avaliação de Medicamentos

DATS – Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde

DCQ – Direção de Comprovação da Qualidade

DGIC – Direção de Gestão de Informação e Comunicação

DGRM – Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

DIL – Direção de Inspeção e Licenciamentos

DIPE – Direção de Informação e Planeamento Estratégico

DPS – Direção de Produtos de Saúde

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

UIM – Unidade de Introdução no Mercado

## INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é um curso com um plano de estudos bastante amplo, refletindo-se na sua imensidão de saídas profissionais, que podem ir da mais comum, Farmácia Comunitária, a Indústria Farmacêutica, a Assuntos Regulamentares, entre outras. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2019)

Enquanto futuros farmacêuticos e, por conseguinte, especialistas do medicamento, os estudantes do MICF devem estudar todo o ciclo de vida do medicamento. Na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), a unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento (ARM) é parte obrigatória do plano de estudos, permitindo aos alunos conhecer os processos pelos quais é necessário passar para se obter o produto final.

Por norma, a imagem do farmacêutico está associada à dispensa do medicamento, quer seja Medicamento Sujeito a Receita Médica (MSRM), quer seja Medicamento Não Sujeito a Receita Médica (MNSRM) ou Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia (MSNRM-EF). Todavia, existe um outro cenário onde o papel do farmacêutico também se revela fundamental, a área regulamentar. Assim, durante o meu percurso académico, a unidade curricular de ARM despertou-me especial interesse, visto que abordava o medicamento de um outro prisma, focando-se no processo que é necessário percorrer de forma a introduzi-lo no mercado. Esta abordagem incentivou-me a querer estagiar no INFARMED – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P., uma oportunidade para aplicar os conhecimentos adquiridos outrora, com o bônus de se tratar de uma entidade com impacto a nível nacional e internacional.

## CONTEXTUALIZAÇÃO

O Infarmed é um Instituto Público integrado no Estado Português, porém com autonomia financeira, administrativa e com património próprio. A sua missão passa por «...regular e supervisionar os setores dos medicamentos, dispositivos médicos e produtos cosméticos e de higiene corporal, segundo os mais elevados padrões de proteção da saúde pública, e garantir o acesso dos profissionais da saúde e dos cidadãos a medicamentos, dispositivos médicos, produtos cosméticos e de higiene corporal, de qualidade, eficazes e seguros.». (INFARMED, 2016)

O Infarmed é composto por diversas unidades orgânicas com funções de negócio:

- Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM);
- Direção de Gestão do Risco de Medicamentos (DGRM);
- Direção de Produtos de Saúde (DPS);
- Direção de Inspeção e Licenciamentos (DIL);
- Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ);
- Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde (DATS);
- Direção de Gestão de Informação e Comunicação (DGIC);
- Direção de Informação e Planeamento Estratégico (DIPE). (INFARMED, 2016)

O meu estágio curricular foi realizado na DAM, por opção própria. Por escolha do Infarmed, fui colocada na Unidade de Introdução no Mercado (UIM), na sala da equipa do Estado-Membro de Referência. Esta equipa é a responsável por processar e analisar as submissões de *Common Technical Document* (CTD) que visam obter Autorização de Introdução no Mercado (AIM) em Portugal, funcionando este como Estado-Membro de Referência.

O período de estágio decorreu de janeiro de 2020 a março de 2020.

## **ANÁLISE SWOT**

Embora por um período diminuto, o estágio curricular que efetuei no Infarmed pode ser analisado criticamente recorrendo a uma análise SWOT (*Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats*). (INFOPÉDIA, 2003-2020) Assim, de seguida descreverei os pontos que considerei fortes, fracos, de oportunidade e de ameaça na minha aprendizagem.

### **I. Pontos Fortes**

#### **I.1. Colocação numa sala com colaboradores**

Como estudante sem qualquer tipo de experiência laboral e sendo este o primeiro estágio curricular a ser realizado, o conhecimento relativamente ao mundo do trabalho era praticamente nulo. Adicionalmente, e embora tivesse sido estudada a função do Infarmed durante o meu percurso académico, não possuía noção prática de como tudo se processava.

Desta forma, a minha colocação, enquanto estagiária, na mesma sala de trabalho que os colaboradores do Infarmed permitiu-me assimilar melhor como tudo se processa, observando as tarefas por estes realizadas, quais as rotinas, quais os procedimentos, quais os meios e linguagens de comunicação, o quotidiano laboral no geral.

#### **I.2. Acesso a bases de dados e programas informáticos**

Dada a notoriedade e impacto do Infarmed, assim como a minha condição de estagiária, surpreendeu-me o acesso que me foi concedido às bases de dados e aos programas informáticos do Infarmed. A juntar a este, também o acesso total às pastas contendo documentos de submissão de AIM e aos ficheiros partilhados entre os colaboradores me impressionou.

As ferramentas que estavam ao meu dispor eram equiparáveis à de uma colaboradora comum, sendo-me fornecido computador próprio, assim como telefone. Adicionalmente também me foi criado um endereço de *e-mail*, com posterior criação de assinatura, no qual constavam os *e-mails* institucionais, assim como os *e-mails* partilhados entre Infarmed e requerentes subordinados aos processos de AIM.

Esta integração total do estagiário no trabalho desenvolvido foi extremamente relevante para o meu desempenho nas funções propostas, assim como para a minha aprendizagem.

### **1.3. Assuntos Regulamentares do Medicamento no prisma da Autoridade Competente**

O Infarmed é um Instituto Público pertencente ao Estado Português, dotado de grande impacto e notoriedade a nível nacional e internacional, já que é o organismo responsável pela regulamentação dos medicamentos e produtos de saúde em Portugal.

A oportunidade de estagiar na UIM possibilitou-me assistir e participar na introdução de medicamentos no mercado, algo só possível no Infarmed, a Autoridade Competente. Durante o período de estágio pude acompanhar de perto todo o processo necessário para que seja concedida uma AIM, desde a receção da submissão do pedido de AIM através da plataforma SMUH-AIM até à sua emissão, assistindo quer a decisões positivas, quer a decisões negativas. Ao longo do estágio realizei alguns destes passos, nomeadamente Validações e elaboração de *Assessment Report* com base nos pareceres dos avaliadores.

Adicionalmente, tomei conhecimento de questões adjacentes ao processo em si, nomeadamente a periodicidade das reuniões das Comissões, assim como do modo de comunicação entre o Infarmed e os requerentes ou Estados-Membros Envolvidos.

Embora secundário, estagiar no Infarmed também me elucidou acerca do seu funcionamento, organização e composição dos recursos humanos.

## **2. Pontos Fracos**

### **2.1. Teletrabalho**

No Infarmed existe a opção de teletrabalho, em que os colaboradores se mantêm contactáveis e na execução das suas tarefas, mas à distância.

Uma vez que as minhas orientadoras, por vezes, adotavam este método, nesse dia tornava-se mais complicada a comunicação, visto que tinha de ser realizada via telefone ou *e-mail*. Esta via impedia não só o contacto mais próximo, mas também dificultava a colocação das dúvidas, já que, na sua maioria, estas eram referentes a conteúdo constante de processos impressos ou dúvidas na pesquisa de pastas no computador, ambas mais facilmente resolúveis pessoalmente.

### **2.2. Introdução teórica excessiva**

O período de estágio iniciou-se, após acolhimento e apresentação da instituição e equipa, com o recordar de informações relevantes para o trabalho que desempenhámos dali em diante. Assim, nos primeiros dias foi-nos recordado o conteúdo relacionado com os

ARM através de apresentações *PowerPoint* e de vídeos. Todavia, enquanto estudante da FFUC, e portanto já abordara a matéria que nos estava a ser transmitida, esta introdução teórica tornou-se excessiva e nalguns aspetos (nomeadamente a apresentação de vídeos a reforçar o que já fora dito oralmente) desnecessária.

### **2.3. Equipa reduzida**

A carga de trabalho das colaboradoras que me estavam a acompanhar era bastante, reflexo de uma insuficiência de recursos humanos, o que dificultou uma formação mais aprofundada e pormenorizada. Todas as informações básicas me foram fornecidas, mas sendo a primeira vez que contactava com esta realidade laboral, foram surgindo algumas dúvidas aquando da execução das funções propostas.

Apesar de todas as questões terem sido prontamente esclarecidas, considero que, caso fosse concedido às orientadoras um pouco mais de tempo para as explicações, isso resultaria em menos dúvidas. Entre as dúvidas mencionadas, destaco a pesquisa de informação dentro de cada processo, visto que, dado o vasto número de pastas, documentos e *e-mails*, se tornava difícil encontrar a informação necessária.

## **3. Oportunidades**

### **3.1. Aperfeiçoar a Língua Inglesa**

O meu nível de conhecimentos em Inglês é considerado Pré-Intermédio. Dado que a maioria do trabalho efetuado pelo Infarmed é em consonância com outros países, este idioma é continuamente solicitado, quer seja na forma escrita ou oral.

Desta forma, durante o período de estágio, necessitei de aperfeiçoar os meus conhecimentos em Inglês para poder interpretar e comunicar. Terminado o estágio, considero que a minha fluência na Língua Inglesa melhorou consideravelmente.

### **3.2. Erros comuns na submissão de pedidos de AIM**

A execução das tarefas requisitadas pelas orientadoras implicava a análise da informação da Parte Aberta do CTD submetido pelo requerente. Dessa análise regularmente resultava a identificação de falhas por parte do requerente, que tinham posteriormente de ser comunicadas ao mesmo.

Ao longo do estágio, fui detetando lapsos na documentação submetida muito semelhantes entre as diversas entidades. Este padrão de falhas tornou-me mais alerta para as

mesmas, quer durante o estágio, quer num eventual futuro profissional relacionado com Assuntos Regulamentares.

## **4. Ameaças**

### **4.1. Dificuldades na Língua Inglesa**

Como supramencionado, o meu nível de conhecimentos da Língua Inglesa é considerado Pré-Intermédio. Desta forma, e tendo em conta o teor internacional do trabalho desenvolvido no Infarmed, este idioma é uma ferramenta essencial.

Uma vez que não domino o Inglês, regularmente era necessário recorrer a ferramentas de tradução, de forma a poder interpretar ou redigir informações. Esta limitação impôs-me um maior dispêndio de tempo na execução das minhas tarefas, quer na leitura, quer na pesquisa das informações, quer na pesquisa de traduções.

Esta questão de ordem idiomática revelou-se uma ameaça ao meu estágio, já que constituía um entrave ao meu ritmo, não me permitindo realizar as tarefas propostas com a celeridade e fluência que pretendia.

### **4.2. COVID-19**

A COVID-19 foi detetada em Portugal pela primeira vez no decorrer do meu estágio no Infarmed. Desta forma, atuando preventivamente, esta instituição decidiu terminar antecipadamente os estágios curriculares.

Apesar de ter sido uma antecipação de apenas duas semanas, considero que esta pandemia me impediu de obter mais conhecimentos e continuar a usufruir da oportunidade de estagiar neste organismo. Adicionalmente, no seguimento do término do estágio, foi cancelada a visita programada ao Laboratório do Infarmed, oportunidade única para um estudante do MICEF.

Assim, no meu ponto de vista, a COVID-19 foi uma ameaça ao meu estágio, já que provocou a cessação precoce do mesmo.

## **CONCLUSÃO**

O Estágio Curricular tem como função dar-nos a conhecer o ambiente laboral e o trabalho que é desenvolvido em determinada saída profissional, de forma a podermos experienciar as áreas para que o MICF nos abre portas. Assim, e recordando o período de estágio decorrido no Infarmed, posso concluir que o objetivo de dar a conhecer a área reguladora e supervisora dos medicamentos e produtos de saúde foi cumprido.

Durante o estágio, apliquei os conteúdos que foram lecionados na unidade curricular ARM, podendo constatar que esta é bastante completa e prepara realmente os estudantes para ingressar nessa área. Os conhecimentos que fui retendo ao longo do estágio permitem-me ter uma visão panorâmica do trajeto que é necessário percorrer para obter um medicamento ou produto de saúde, o que constitui uma mais-valia para uma futura farmacêutica quer seja nesta ou noutra saída profissional.



## **BIBLIOGRAFIA**

AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I.P. – **Apresentação**. Lisboa, Portugal: INFARMED, I.P., 2016. [Acedido a 20 de março de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>

AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I.P. – **Estrutura e Organização**. Lisboa, Portugal: INFARMED, I.P., 2016. [Acedido a 20 de março de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao>

INFOPÉDIA – **SWOT**. Porto, Portugal: Porto Editora, 2003-2020. [Acedido a 20 de março de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/siglas-abreviaturas/SWOT>

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **Estudo da Empregabilidade: do ensino à profissão farmacêutica**. Lisboa, Portugal: Ordem dos Farmacêuticos, 2019. [Acedido a 20 de março de 2020]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor/2/Newsletter/Documentos/Apresentacao\\_Estudo\\_Empregabilidade\\_2018\\_12\\_Fev\\_2019\\_2.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor/2/Newsletter/Documentos/Apresentacao_Estudo_Empregabilidade_2018_12_Fev_2019_2.pdf)

## **PARTE II**

### **RELATÓRIO DO ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA**

**Farmácia Gaspar**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

ANF – Associação Nacional das Farmácias

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MNSRM-EF – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia

MSRM – Medicamento Sujeito a Receita Médica

## INTRODUÇÃO

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) é um curso bastante amplo, exibindo uma panóplia de saídas profissionais, sendo a mais comum a Farmácia Comunitária. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2019) Desta forma, é imperativo que os estudantes do MICF tenham um contacto próximo com esta, compreendendo o seu funcionamento e adquirindo conhecimentos valiosos para o seu futuro, quer seja nesta ou noutra saída profissional. Neste sentido, é com toda a plausibilidade que o estágio em farmácia comunitária está incluído no plano curricular do MICF, inserido na unidade curricular Estágio Curricular.

Devido à sua conotação mais prática, o estágio complementa e consolida o que nos foi lecionado. Assim, é-nos possível não só colocar em prática o que aprendemos durante o curso, mas também relembrar e adicionar conhecimentos, assim como aplicá-los em contexto real. Adicionalmente, o estágio em Farmácia Comunitária promove o contacto com os utentes, peça-chave na área farmacêutica. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2001) O contacto próximo com estes permite-nos observá-los, bem como conhecer as suas características, as suas necessidades, os pontos de melhoria e os pontos a manter no atendimento, aprendendo a trabalhar com e para eles. A experiência que vivenciamos e os conhecimentos que nos são transmitidos moldam-nos enquanto futuros farmacêuticos, demonstrando-nos o impacto que temos na saúde da população e permitindo-nos tomar consciência da nossa importância enquanto agentes de saúde pública de primeira linha. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2001) Como na sua maioria os estudantes desconhecem a realidade laboral, o estágio mimetiza a transição entre ser estudante e ser trabalhador.

De uma forma geral, um estágio desta índole compreende o acompanhamento e execução de tarefas de forma gradual, percorrendo todos os passos necessários para garantir o melhor atendimento possível ao utente, com base nas melhores relações Benefício/Risco e Benefício/Custo. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2001) Com esta finalidade, é fundamental analisar os medicamentos e demais produtos de saúde que pretendemos aprovisionar, gerir os stocks existentes, atualizarmo-nos legal e cientificamente e dispensar corretamente. No final do estágio, é expectável que estejamos capacitados para ingressar em farmácia comunitária com plena consciência do que ela representa e de como funciona.

O meu estágio curricular foi realizado na Farmácia Gaspar, em Coimbra, decorrendo de maio 2020 a setembro de 2020.

## CONTEXTUALIZAÇÃO

A Farmácia Gaspar está localizada na Rua Carlos Seixas, em Coimbra, junto ao Bairro Norton de Matos e próxima da Unidade de Saúde Familiar Briosa. A Direção Técnica é assumida pela Dra. Ana Filipa Couto, sendo a Dra. Sara Couto, responsável pela Gestão, a proprietária. A equipa da Farmácia é ainda constituída pela Dra. Ana Paula Soares, pela Dra. Ana Sofia Sousa, pela Dra. Ana Rita Rodrigues e, mais recentemente, pela Dra. Ana Mafalda Nicolau. O horário de funcionamento é das 8h30min às 20h30min, de 2ª feira a sábado, efetuando um turno de serviço permanente mensal.

A farmácia está dividida em vários setores: sala de atendimento ao público, zona de armazenamento de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), zona de armazenamento de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) e medicamentos não sujeitos a receita médica de dispensa exclusiva em farmácia (MNSRM-EF), instalações sanitárias, zona de frio, zona de receção de encomendas, zona de reservas, laboratório, copa, gabinete de Direção Técnica, gabinete de consultas de Podologia/Nutrição e Dietética e gabinete de Serviços Farmacêuticos.

Na zona de atendimento estão em utilização três balcões, estando dois protegidos com acrílico devido às normas de higiene e segurança subordinadas à COVID-19. Além das zonas destinadas a MNSRM atrás dos balcões, existem também zonas dedicadas a Dermofarmácia e Cosmética, a Puericultura, a Suplementos Alimentares, entre outros produtos de saúde, assim como exposição dos produtos pertencentes ao sistema do Cartão Saúde.

Ao nível dos Serviços Farmacêuticos, são efetuadas consultas por marcação de Podologia e consultas semanais de Nutrição e Dietética, ministradas por um podologista e uma nutricionista, respetivamente, assim como testes bioquímicos (glicémia, colesterol total, triglicéridos, pressão arterial).

## **ANÁLISE SWOT**

Durante o estágio vivenciei diversos momentos que interpretei de diferentes perspetivas. Algumas situações foram tão proveitosas que as considero os pontos fortes do estágio; outras foram mais limitantes, classificando-as como pontos fracos; outras ainda permitiram-me desenvolver aptidões e conhecimentos que não são intrínsecos ao estágio, constituindo oportunidades; por fim, algumas colocaram em risco a minha boa prestação e o desenrolar do meu estágio, considerando-as uma ameaça. Assim, apresento de seguida a minha análise SWOT (do inglês *Strengths-Weaknesses-Opportunities-Threats*) do estágio curricular na Farmácia Gaspar. (INFOPÉDIA, 2003-2020)

### **I. Pontos Fortes**

#### **I.1. Bom ambiente no local de trabalho**

Enquanto estagiários, a nossa atitude é moldada fortemente pela motivação e segurança que nos são transmitidas, aspetos para os quais contribui muito o meio envolvente.

Na minha ótica, o ambiente da Farmácia Gaspar é excelente, pois permitiram-me aprender, prontificando-se a esclarecer qualquer questão, assim como a explicar-me o procedimento correto quando falhava algo, motivando-me e inculcando-me a necessidade de procurar sempre saber mais.

A entreatajuda, a cooperação e a comunicação foram uma constante e isso resultou num estágio mais estruturado e confiante.

#### **I.2. Tarefas de *backoffice* diversificadas**

Nos bastidores de um bom serviço prestado aos utentes está uma cadeia de ações que culmina no medicamento/produto de saúde certo para a pessoa certa. Visando este binómio, é necessária uma organização exímia no *backoffice* da farmácia, que passa pela análise e gestão de encomendas, gestão de *stocks*, gestão de campanhas, comunicação com fornecedores, comunicação com laboratórios, comunicação com delegados, cumprimento de questões legais (por exemplo, o receituário), atualização da informação disponível (por exemplo, Circulares emitidas pela Associação Nacional de Farmácias (ANF)), organização do espaço e do tempo, entre outras tarefas que permitem o equilíbrio da farmácia.

Durante o estágio, pude observar e executar estas tarefas, o que me permitiu assimilar a farmácia como um todo e consciencializar-me da importância de funções que outrora desconhecia.

### **1.3. Quadro KAIZEN**

A filosofia KAIZEN prima pela organização e otimização dos recursos. Na Farmácia Gaspar, esta filosofia está implementada fisicamente com recurso a um quadro que reflete o estado atual da farmácia, aspetos a manter, assim como as melhorias necessárias e os objetivos a serem alcançados. Neste quadro consta o calendário de eventos, a análise de indicadores (nomeadamente a evolução do sistema do Cartão Saúde e de outros objetivos de vendas), as sugestões de melhoria, o quadro PDCA (Planear-Desenvolver-Confirmar-Atuar), em que podemos consultar o estado das tarefas atribuídas a cada colaborador, o mapa de tarefas, a área de comunicação e Outros Assuntos (como os *cross-selling* realizados).

Este quadro permitiu-me, assim como aos outros colaboradores, em qualquer altura, ter uma noção do panorama da farmácia e em que aspeto podia intervir para melhorar.

A aplicação diária desta filosofia demonstra que a organização e a comunicação proporcionam melhores resultados num espaço de tempo útil.

Enquanto estagiária, a análise do quadro KAIZEN possibilitou integrar-me nos objetivos da farmácia e tomar consciência de que pequenos pormenores de cada colaborador influenciam o todo.

### **1.4. Cartão Saúde**

A Farmácia Gaspar está inserida na rede de farmácias que utiliza o sistema do Cartão Saúde. Este cartão permite acumular pontos em troca de compras na farmácia, podendo estes depois ser rebatidos por produtos constantes num catálogo Saúde (desde rebuçados a géis de banho ou pastas de dentes) ou por Serviços Farmacêuticos.

Este sistema permitiu um estreitamento da relação com os utentes, tornando o atendimento mais comunicativo e acrescentando ainda a possibilidade de prestar aconselhamento na escolha dos produtos, nomeadamente géis de banho e patologias da pele, culminando numa maior satisfação do utente com a minha prestação.

### **1.5. Análise de produtos sem consumo**

A Farmácia Gaspar prima pela excelente gestão dos seus *stocks*. Desta forma, mensalmente são analisados os MNSRM com menor rotatividade, investigando-se a sua ficha técnica, permitindo conhecê-los melhor e, assim, futuramente aconselhá-los.

A atividade supramencionada, além de rentável economicamente para a farmácia, para mim, enquanto estagiária, foi uma mais-valia na aquisição de conhecimentos sobre

determinados temas, patologias e substâncias ativas, sendo uma oportunidade de aumento dos meus conhecimentos e conseqüente melhoria de atendimento.

## **1.6. Serviços Farmacêuticos**

Na Farmácia Gaspar são medidos diversos parâmetros bioquímicos, nomeadamente pressão arterial, glicémia, colesterol total e triglicéridos. A realização destes testes constituiu uma oportunidade para uma intervenção mais personalizada e próxima do utente, uma vez que foram realizados num gabinete, com toda a atenção dirigida para a pessoa em questão e com maior proximidade física.

Aquando da realização destes testes bioquímicos, pude prestar vários aconselhamentos que, na minha ótica, foram mais acatados do que seriam no balcão, além de estreitarem a minha relação com o indivíduo em causa. De entre os aconselhamentos prestados, destaco o diálogo com os utentes diabéticos, que, na sua maioria, desconheciam a importância de ingerir alimentos regularmente, assunto que dificilmente seria abordado aquando do atendimento ao balcão.

## **2. Pontos Fracos**

### **2.1. Equipa reduzida**

Numa fase inicial do estágio, enfrentei uma realidade completamente nova, num ambiente desconhecido e com uma grande bagagem de conhecimentos que tinham então de ser aplicados. Assim, inicialmente, e face à ausência de experiência, foi necessário um acompanhamento mais constante.

A Farmácia Gaspar tem, na minha opinião, uma equipa reduzida, o que dificultou o desenrolar das minhas atividades, principalmente nas semanas iniciais do estágio, em que não possuía autonomia e necessitava de auxílio para finalizar a maioria das tarefas, nomeadamente encomendas e marcação de preços.

### **2.2. Clientes homogéneos**

Cada caso é um caso. Assim sendo, a experiência é uma mais-valia para o desenvolvimento profissional de um farmacêutico. Como profissionais de saúde especialistas do medicamento, além da dispensa de MSRM, temos um papel bastante ativo na dispensa de MNSRM e MNSRM-EF, situações em que podemos marcar a diferença e auxiliar o utente sem que este necessite de recorrer a Unidades de Saúde.



Os utentes da Farmácia Gaspar são, na sua maioria, doentes crónicos, tais como diabéticos ou hipertensos. Por conseguinte, o aconselhamento farmacêutico em virtude de situações peculiares e de requisição/dispensa de MNSRM não foram tão comuns como eu desejaria. Apesar de me terem sido transmitidos conhecimentos acerca dos MNSRM e outros produtos de saúde, considero que a aplicação prática desses conhecimentos ficou aquém das minhas expectativas.

### **3. Oportunidades**

#### **3.1. Formações externas**

Apesar do plano de estudos do MICF ser bastante completo, a ciência não é estática e vão surgindo novos produtos, novas atualizações, novas informações. Como tal, é essencial que um profissional, independentemente da sua área, procure sempre saber mais e estar o mais informado possível. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2001) Quando somos detentores de mais conhecimento, conseguimos prestar um melhor serviço ao utente, assim como transmitir-lhe informação de forma mais clara e confiante.

Desta forma, as formações que foram sendo ministradas ao longo do estágio, relacionadas com produtos buco-dentários, com suplementos alimentares ou com produtos naturais, por exemplo, revelaram-se uma mais-valia para o meu percurso, recordando certos temas, acrescentando conteúdo ao que já conhecia ou ensinando-me algo novo, constituindo uma oportunidade de melhoria dos meus conhecimentos e, conseqüentemente, da minha prestação.

#### **3.2. Duas estagiárias**

A condição de estagiária única implica uma canalização total do tempo para a nossa aprendizagem, o que não acontece quando partilhamos o estágio com outra pessoa. Todavia, considero que o estágio partilhado apresentou mais benefícios, já que o trabalho em equipa permitiu-me desenvolver a cooperação, a entreaajuda, a comunicação e a organização, aspetos essenciais na vida pessoal e profissional.

A partilha do estágio com outra aluna implicou comunicar-nos, de forma a otimizarmos as tarefas que nos eram requeridas, complementando o trabalho uma da outra e tentando esclarecer-nos mutuamente. Adicionalmente, o facto de sermos duas estagiárias possibilitou que as questões colocadas fossem em maior número e com maior diversidade, melhorando a aprendizagem de ambas.

## **4. Ameaças**

### **4.1. COVID-19**

Na farmácia, além da dispensa de medicamentos e/ou produtos de saúde, também se procura um atendimento simpático e personalizado. Para tal, contribui muito a linguagem corporal e o contacto com o utente.

No contexto da pandemia da COVID-19, foram implementadas medidas de segurança, nomeadamente o uso obrigatório de máscara e a colocação de acrílico nos balcões de atendimento. Esta barreira física entre farmacêutico e utente tornou o atendimento mais distante e frio, além de perturbar a nível de logística e audição, dificultando muitas vezes a comunicação, ameaçando assim a minha prestação.

### **4.2. Fase de crescimento da Farmácia Gaspar**

A Farmácia Gaspar mudou de proprietária, assim como de Direção Técnica, em setembro de 2019. Desta forma, encontra-se ainda em crescimento e na fase de conquista e fidelização do público, já que a sua tipologia é a de clientes habituais e poucos são os que estão apenas de passagem.

Enquanto estagiária em fase de aprendizagem, a probabilidade de cometer falhas era significativa, o que impactava negativamente a relação do utente com a farmácia, situação indesejável quando se está numa fase de crescimento. No sentido de atenuar as repercussões resultantes das minhas falhas, a minha autonomia no atendimento ao público foi limitada, o que considero uma ameaça à minha aprendizagem plena.

### **4.3. Produtos de Uso Veterinário**

Os utentes da Farmácia Gaspar requisitaram bastante produtos de uso veterinário, maioritariamente desparasitantes. No entanto, e apesar de no plano de estudos do MICEF estar incluída a unidade curricular Produtos de Uso Veterinário, senti que não detinha a capacidade necessária para poder aconselhar e dispensar medicamentos veterinários. Deste modo, sinto que a falta de conhecimentos que possuía em relação aos produtos existentes e à saúde animal no geral foram uma ameaça aos meus atendimentos desta índole.

## CASOS PRÁTICOS

### Caso 1

Um utente do sexo masculino, com 81 anos, dirigiu-se à farmácia com uma prescrição eletrónica da sua medicação crónica, em que estava incluído o Tromalyt® e o Eliquis® 5 mg.

Uma vez que se trata de um antiagregante plaquetar e de um anticoagulante, respetivamente, com efeitos sinérgicos na coagulação sanguínea, a sua toma associada poderia acarretar graves efeitos secundários, nomeadamente hemorragias. Deste modo, questioneei o utente acerca de eventos cardíacos recentes e se fazia a terapêutica dupla, obtendo uma resposta negativa.

Ao analisar o histórico de vendas do utente em questão, verifiquei que a última venda fora efetuada em setembro de 2019. Assim, contactei a USF do utente, pedindo para esclarecer uma dúvida de terapêutica com a médica prescritora. Após conseguir estabelecer contacto com a mesma, foi concluído que se tratava de um erro de prescrição e que o Tromalyt® não deveria ser dispensado.

### Caso 2

Uma utente do sexo feminino dirigiu-se à farmácia com a sua filha de 15 anos, afirmando que esta se queixava de prurido associado a picadas de insetos e solicitando SYNALAR® N.

Em primeira instância, observei as mencionadas picadas, que efetivamente correspondiam a picadas de insetos comuns, descartando a existência de picadas noutra zona do corpo que não o braço esquerdo. De seguida, informei a utente da obrigatoriedade de apresentação de receita médica para obtenção do medicamento solicitado, informando também que a pomada em questão continha um corticosteróide com atividade anti-inflamatória e um antibiótico, moléculas não indicadas para o estado das feridas em questão e cujo uso promoveria o aparecimento de efeitos secundários desnecessários, assim como a resistência aos antibióticos. Assim sendo, aconselhei a toma de um anti-histamínico oral, a cetirizina. Adicionalmente, e para aliviar a sensação de prurido e a tendência de coçar indiquei Benaderma® Pruri: uma loção com calamina e cânfora, tendo propriedades anti-pruriginosas, analgésicas e protetoras.

## CONCLUSÃO

Em suma, considero que o estágio curricular que efetuei na Farmácia Gaspar cumpriu o seu propósito de complementar a minha aprendizagem e de me colocar em contacto com o ambiente laboral. Terminei o período de estágio consciente do funcionamento de uma farmácia comunitária, assim como do papel do farmacêutico e de como o posso desempenhar da melhor maneira possível. Com esta experiência pude compreender que o sucesso de um farmacêutico e de uma farmácia comunitária assenta em dois aspetos fundamentais: ter como alvo principal o utente e adotar medidas de organização e gestão farmacêuticas.

Reverendo todo o período de estágio, sinto que, de forma gradual, foram sendo acrescentados conhecimentos aos que adquirira na Faculdade de Farmácia, algo que deve ser uma constante na minha vida profissional. (ORDEM DOS FARMACÊUTICOS, 2001)

Assim, considero o balanço do meu estágio curricular na Farmácia Gaspar positivo, onde os benefícios para a minha aprendizagem pessoal e profissional superaram quaisquer pontos fracos.

## **BILBIOGRAFIA**

INFOPÉDIA – **SWOT**. Porto, Portugal: Porto Editora, 2003-2020. [Acedido a 20 de março de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/siglas-abreviaturas/SWOT>

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **CÓDIGO DEONTOLÓGICO DA ORDEM DOS FARMACÊUTICOS**. Lisboa, Portugal: Ordem dos Farmacêuticos, 2001. [Acedido a 4 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo\\_deontologico\\_da\\_of\\_4436676175988472c14020.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf)

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS – **A Farmácia Comunitária**. [Acedido a 4 de setembro de 2020]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

## **PARTE III**

### **MONOGRAFIA**

**“Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?”**

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMR – Antimicrobial resistance (Resistência a antimicrobianos)

ARG – Antibiotic-resistance Genes (Genes de resistência a antibióticos)

BMRG – Biocides/Metals-resistance Genes (Genes de resistência a biocidas/metais)

CMI – Concentração Mínima Inibitória

CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

DNA – Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)

ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control (Centro Europeu para o Controlo e Prevenção da Doença)

EDTA – Ethylenediamine Tetraacetic Acid (Ácido Etilenodiamino Tetra-acético)

HGT– Horizontal Genes Transfer (Transferência Horizontal de Genes)

HTS – High Throughput Screening

ICE – Integrative Conjugative Elements (Elementos Conjugativos Integrativos)

Int – Integrons (Integrões)

IS – Insertion sequences (Sequências de inserção)

LPS – Lipopolissacáridos

MDR – Multidrug-resistant (Multirresistente)

MGE – Mobile Genetic Elements (Elementos Genéticos Móveis)

MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBP – Penicillin-binding Proteins (Proteínas de ligação à penicilina)

PDR – Pandrug-resistant (Pan-resistente)

QAC – Quaternary Ammonium Compounds (Compostos de Amónio Quaternário)

RGN – RNA-guided Nucleases (Nucleases guiadas por RNA)

ROS – Reactive Oxygen Species (Espécies Reativas de Oxigénio)

rRNA – RNA ribossómico

Tn – Transposons (Transposões)

tRNA – RNA de transferência

*v.g.* – *verbi gratia*

## RESUMO

Os biocidas são utilizados desde a Antiguidade, sendo atualmente aplicados nas mais diversas áreas: cuidados de saúde humana e animal, higiene pessoal, limpeza e desinfecção de superfícies, cosméticos, tratamento de águas, agricultura, indústria alimentar, pecuária, construção civil, entre outros. Contudo, estes compostos caíram em desuso com a descoberta dos antibióticos no século XX, tendo sido recuperada a sua utilização nas últimas décadas, em muito devido ao surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes (MDR), que colocaram em causa a eficácia destes compostos e a segurança da saúde pública a nível mundial.

Assim, surge a questão: pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?

Nesta monografia pretendeu-se, através de uma revisão bibliográfica, analisar e descrever os fatores determinantes que podem contribuir para a pressão seletiva exercida pelos biocidas nas comunidades bacterianas, incluindo a possibilidade da sua utilização excessiva promover a seleção de bactérias MDR através de eventos de co-resistência, resistência cruzada, co-seleção e co-regulação, com recurso à Transferência Horizontal de Genes (HGT) através de Elementos Genéticos Móveis (MGE).

Sendo a resistência aos antibióticos um problema de saúde pública mundial, várias organizações internacionais têm apelado a uma maior vigilância e monitorização da utilização dos antimicrobianos nos diferentes ambientes (saúde humana e animal, ambiente) adotando uma política de *One Health* com o objetivo de combater a disseminação de bactérias MDR protegendo, deste modo, a saúde pública mundial.

**Palavras-chave:** Biocidas; Resistência a Antimicrobianos; Co-resistência; Resistência Cruzada; Co-seleção; Transferência Horizontal de Genes.



## **ABSTRACT**

Biocides have been used since ancient times, being currently applied in the most diverse areas: human and animal health care, personal hygiene, cleaning and disinfection of surfaces, cosmetics, water treatment, agriculture, food industry, cattle raising, civil construction, among others. However, these compounds fell into disuse with the discovery of antibiotics in the twentieth century. Its use has been recovered in recent decades, largely due to the emergence and spread of multidrug-resistant bacteria (MDR), which have called into question the efficacy of these compounds and worldwide public health safety.

Thus, the question arises: can the massive usage of biocides contribute to the selection of multi-resistant bacteria to antibiotics?

This monograph aimed, through a literature review, to analyze and describe the determining factors that can contribute to the selective pressure exerted by biocides in bacterial communities, including the possibility that their excessive use is a promoter of the selection of MDR bacteria through events of co-resistance, cross-resistance, co-selection and co-regulation, using horizontal gene transfer (HGT) through Mobile Genetic Elements (MGE).

Since antibiotic resistance is a global public health problem, several international organizations have been calling for greater surveillance and monitoring of the use of antimicrobials in different environments (human and animal health, environment) by adopting a One Health policy aimed at combating the spread of MDR bacteria, thereby protecting global public health.

**Keywords:** Biocides; Antimicrobial Resistance; Co-resistance; Cross-resistance; Co-selection; Horizontal Genes Transfer.

## INTRODUÇÃO

Desde muito cedo, e apesar de na época ser desconhecida a etiologia das doenças que afetavam o Homem e os animais, a ação de organismos vivos foi considerada responsável pelo espoletar de várias doenças. Assim, era necessário erradicá-los, recorrendo a métodos de desinfecção, que poderiam ser de índole química, física ou biológica. (BLANCOU, 1995)

Os desinfetantes, tal como os antissépticos e os conservantes, pertencem à classe dos biocidas (SCENIHR, 2009), que consistem em «...qualquer substância ou mistura, na forma em que são fornecidos ao utilizador, que consistam, contenham ou que gerem uma ou mais substâncias ativas, com o objetivo de destruir, repelir ou neutralizar um organismo prejudicial, prevenir a sua ação ou controlá-la de qualquer outra forma, por meios que não sejam a simples ação física ou mecânica...». (UNIÃO EUROPEIA, 2012; SCENIHR, 2009)

Atualmente, os biocidas são empregues em inúmeras situações, desde cuidados de saúde humana e animal, higiene pessoal, limpeza de superfícies, cosméticos, tratamento de águas, incluindo a agricultura. (SCENIHR, 2009) Contudo é de ressaltar que a utilização destes compostos antimicrobianos é reportada desde a Antiguidade. (LEMIRE *et al.*, 2013) Já a descoberta dos antibióticos remonta à segunda década do século XX, permitindo a sua utilização na terapêutica e profilaxia de diversas patologias infecciosas, o que contribuiu para uma diminuição muito representativa da taxa de mortalidade associada a essas doenças. (AMINOV, 2017)

No entanto, devido ao uso massivo destes compostos, particularmente dos antibióticos, atualmente, a Humanidade enfrenta a ineficácia destes agentes antimicrobianos devido ao surgimento e disseminação de bactérias multirresistentes (MDR), comprometendo a saúde pública mundial e, conseqüentemente, é uma das maiores preocupações e desafios do século XXI. (SCENIHR, 2009; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

## **I. BIOCIDAS**

### **I.1 Perspetiva Histórica: da Antiguidade aos nossos dias**

O conhecimento científico acerca do modo como os microrganismos causavam doenças que acometiam o Homem e os animais só surgiu no século XIX. Não obstante, já no século I d.C. se considerava que os organismos vivos poderiam ser fonte de doenças, tal como descreveu Marcus Terentius Varro: «There perhaps exist, in marshy places, animals which are invisibly small, and which cause serious diseases by invading the body through the mouth or nose.», tendo-se tornado imperativa a utilização de meios que combatesses estes microrganismos. (BLANCOU, 1995)

Segundo descrições bíblicas, os Hebreus, quando regressavam da guerra, procediam à incineração das suas roupas e equipamento. Também na Idade Média as vestes dos doentes com Peste Negra eram sujeitas à mesma prática, visando evitar a disseminação da doença. Ao longo da História foram sendo adotados vários métodos de desinfecção por diferentes povos, havendo relatos da utilização de químicos (enxofre, mercúrio, cobre, bases e ácidos), agentes físicos (temperatura, fumigação, secagem e filtração) ou agentes biológicos (ação enzimática, alteração de pH, pressão, temperatura e oxigenação) (Tabela 1). (BLANCOU, 1995)

A desinfecção por meios químicos também foi bastante utilizada, nomeadamente pelo Império Persa (cerca de 450 a.C.), que armazenava a sua água potável em vasos de cobre ou prata e, para o tratamento de feridas, recorria a vinho, vinagre e mel. (FRAISE, 2004) Adicionalmente, os compostos de mercúrio foram introduzidos na medicina pelo povo árabe e, posteriormente, em Itália (1429) assumindo um papel importante no combate à sífilis. Também na China, Índia, Egito e Europa, estes compostos eram empregues em tintas e revestimentos. (BLANCOU, 1995)

Atentando na preservação, o recurso a preservantes naturais foi prática comum, quer para os caçadores-recoletores, que aplicavam sal e especiarias na carne e peixe de forma a conservá-los, quer para os egípcios, que os utilizavam em bálsamos para a mumificação. (FRAISE, 2004)

Não só no quotidiano, mas também em episódios excecionais, como a Peste Negra na Idade Média, foi necessário recorrer a métodos que contivessem as doenças. Seguindo a ideologia grega de que o ar poderia ser transmissor de doenças, assim como a associação destas a maus odores, efetuava-se a queima de ramos de zimbro e de enxofre em locais potencialmente contaminados. (FRAISE, 2004) A fumigação com enxofre foi aplicada também durante a Peste Bovina, com o mesmo objetivo. Ainda no contexto desta epidemia, Lancisi (1715) aconselhou que as superfícies sujeitas a contaminação fossem lavadas com cal ou

vinagre, estendendo esta prática a pessoas ou animais que tivessem tido contacto com casos de Peste Bovina. (BLANCOU, 1995)

Podemos considerar que a utilização dos biocidas foi transversal a inúmeros marcos da História, nomeadamente durante a Peste Negra na Idade Média, a Peste Bovina e nas Primeira e Segunda Guerras Mundiais. (BLANCOU, 1995; UENO *et al.*, 2018) Nestes dois marcos da História Bélica foi decisiva a utilização de antissépticos de forma a tratar as feridas dos soldados e impedir septicémias, tendo a solução de Dakin sido amplamente utilizada (Tabela I). (UENO *et al.*, 2018)

Apesar da preservação dos alimentos e desinfeção da água serem uma preocupação que remonta à Antiguidade, o mesmo não se verificou relativamente aos produtos farmacêuticos, em que essa preocupação apenas teve lugar em 1960. (FRAISE, 2004)

**Tabela 2:** Dados cronológicos da descoberta ou utilização de biocidas ao longo da História. (Adaptado de BRAWANSKI, 2012; FRAISE., 2004)

DATA	ACONTECIMENTO
Aproximadamente 1600 b.C.	Uso de sal de cobre como adstringente
Desde a Idade Média	Uso de cloreto de mercúrio no tratamento de feridas
1700	Alcatrão vegetal é usado na preservação das madeiras dos navios
1705	Homburg utiliza cloreto de mercúrio na preservação das madeiras dos navios
1798	Produção de pó branqueador pela primeira vez
Início do século XIX	Alcatrão vegetal e mineral são usados no tratamento de feridas
1815	Introdução de cloreto de zinco
1827	Alcock utiliza o pó branqueador como desodorizante e desinfetante
1832	William Henry estuda o efeito do calor na inibição da transmissão de doenças
1836-1837	Smith descreve o uso de creosote no tratamento de feridas
1839	Davies sugere o uso de iodo para o tratamento de feridas
1843	Lefevre introduz a água com cloro
1850	Le Beuf prepara um extrato de alcatrão mineral
1860	Küchenmeister usa uma solução de fenol puro no tratamento de feridas Joseph Lister usa fenol nos seus estudos subordinados à cirurgia antisséptica
1875	Bucholtz determina a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do fenol, do creosote, do ácido benzóico e do ácido salicílico
1889	Geppert usa sulfeto de amónio como agente neutralizante do cloreto de mercúrio
1893	Traugott observa pela primeira vez Peróxido de Hidrogénio
1915	Dakin observa a existência de compostos libertadores de cloro
1916	Jacobs introduz os Compostos de Amónio Quaternário (QAC)
1958	A atividade da clorhexidina é descrita

## **1.2. A razão do seu ressurgimento**

O uso de biocidas, nomeadamente dos metais, quer na desinfeção de água para consumo, quer na preservação de alimentos, remonta à Antiguidade. Estes compostos contribuíram de forma indiscutível para a História da Medicina, ao serem utilizados no tratamento de patologias como lepra, tuberculose, gonorreia, sífilis, entre outras. (LEMIRE *et al.*, 2013)

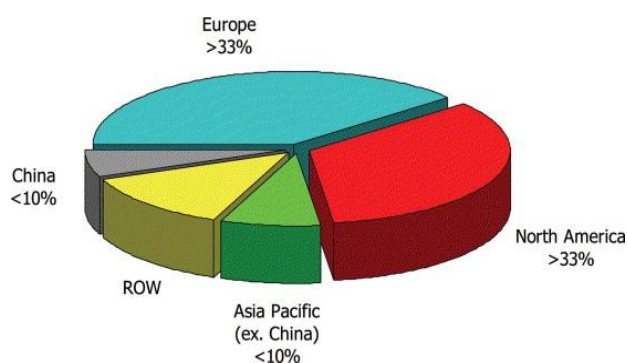
Todavia, com a descoberta da penicilina em 1928 e, nos anos subsequentes, com a descoberta de outros antibióticos, os metais acabaram por perder o seu destaque, o que contribuiu para o decréscimo da sua utilização. (LEMIRE *et al.*, 2013) Contudo, a partir do início do século XXI, com o aumento de infeções por bactérias MDR associadas à ineficácia das alternativas terapêuticas disponíveis, observou-se o ressurgimento da utilização dos metais, devido à sua comprovada atividade antimicrobiana. (KARMAKAR E GAITONDE, 2019; LEMIRE *et al.*, 2013) Os metais conduzem à produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e diminuição dos níveis de antioxidantes, à disfunção proteica e perda de atividade enzimática, à interferência com a absorção de nutrientes, a danos membranares e a danos no ácido desoxirribonucleico (DNA). (LEMIRE *et al.*, 2013) Adicionalmente, as nanopartículas à base de metais também podem transportar os antibióticos, permitindo uma libertação seletiva e controlada dos mesmos, o que reduz os efeitos secundários. (KARMAKAR E GAITONDE, 2019) Uma abordagem que se afigura vantajosa para o tratamento de infeções por bactérias MDR consiste na associação sinérgica de metais, com eficácia antimicrobiana, a moléculas de antibióticos já existentes ou recentemente descobertas. (KARMAKAR E GAITONDE, 2019; LEMIRE *et al.*, 2013) Apesar dos resultados promissores destes compostos quanto à sua atividade antimicrobiana, é necessário ter em consideração a sua toxicidade para o Homem e para o ambiente. (LEMIRE *et al.*, 2013)

## **1.3. A sua importância nos diversos setores da Economia**

Apesar de os biocidas serem sujeitos a regulamentação legislativa pela União Europeia e carecerem de autorização prévia à sua introdução no mercado (Regulamento n° 528/2012 (EU)), o facto é que se verifica escassez de dados sobre o seu volume de vendas, situações de acidentes por uso indevido ou não, ou até mesmo utilização de substâncias não autorizadas. (EUROPEAN UNION, 2019) Neste contexto, e tendo em consideração que a sua produção e utilização se encontram relacionadas com a elevada utilização em diversas áreas da economia (cuidados de saúde e higiene pessoal, indústria alimentar, agricultura e ambiente de produção animal, tratamento de águas, construção civil, entre outros) (SCENIHR, 2009), a União

Europeia publicou em 2019 o *Overview Report Biocides*, onde participaram cinco Estados-Membros (Hungria, Alemanha, Espanha, Bélgica e Holanda) e cuja missão é monitorizar e avaliar a implementação do disposto no Regulamento nº 528/2012 (EU), harmonizando as regras entre os diferentes Estados-Membros no que respeita à comercialização dos biocidas, garantia dos níveis de segurança humana, animal e ambiental, implementação de ações que previnam a comercialização de substâncias não autorizadas e acesso a dados de volumes de vendas, incluindo as realizadas *on-line* (o que já se verifica em países como a Holanda e Bélgica). É ainda reforçado neste documento que a recolha de dados de vendas pelas Autoridades Competentes é muito importante para a gestão do risco. (EUROPEAN UNION, 2019)

Um exemplo de setor do mercado dos biocidas é a indústria dos plásticos, que contribui exponencialmente para o crescimento deste mercado: dados referentes a 2005 revelam a utilização de 15,4 milhões de quilogramas de biocidas (Europa; Estados Unidos da América; Ásia e China) (Figura 1). (MARKARIAN, 2006)



**Figura 1:** Consumo global de Biocidas, por regiões, na indústria de plásticos (ANEXO I). (MARKARIAN, 2006)

#### 1.4. Classes e Mecanismos de ação

A classificação dos biocidas pode ser dividida em 22 grupos, consoante o grupo funcional, ou em 4 grupos, consoante a sua atuação no local alvo bacteriano. (GNANADHAS *et al.*, 2013) A maioria dos biocidas não possui um alvo específico, atuando em diferentes locais alvo da célula microbiana simultaneamente (Tabela 2). (GNANADHAS *et al.*, 2013; LAMBERT, 2004)

As estruturas moleculares destes produtos são diferentes entre si, apresentando diversos mecanismos de ação. (LAMBERT, 2004) Os biocidas podem atuar ao nível da parede celular, membrana celular, proteínas e ácidos nucleicos. O efeito dos biocidas nos microrganismos pode passar por alterações morfológicas nos componentes celulares

externos, libertação do conteúdo citoplasmático, inibição de processos energéticos associados à membrana celular, como a fosforilação oxidativa e a Força Motriz de Protões, desnaturação ou coagulação proteica, ação em enzimas específicas ou interações com os ácidos nucleicos e consequente impedimento da replicação e transcrição. (MAILLARD, 2002)

Os aldeídos, como o formaldeído e o glutaraldeído, e os agentes esterilizantes, como o óxido de etileno, reagem com as biomoléculas através da alquilação, conduzindo a inibições proteicas e de divisão celular; o peróxido de hidrogénio, o ácido peracético, o cloro e as isotiazolonas através da oxidação e os hipocloritos através da halogenação, provocando inibição proteica. Já o agente quelante Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) apresenta especificidade de ligação para iões metálicos, nomeadamente o magnésio, conduzindo à perda da função de barreira da membrana celular e aumentando a suscetibilidade das células a outros compostos. As acridinas também apresentam especificidade de ligação para os ácidos nucleicos, intercalando-se entre bases contíguas e, consequentemente, inibindo a replicação. Compostos como o etanol, clorhexidina, compostos de amónio quaternário (QAC), biguanidas e compostos fenólicos atuam provocando desnaturação proteica e interferindo com a estrutura da membrana e parede celulares. (GNANADHAS *et al.*, 2013; LAMBERT, 2004)

Determinados compostos, como os fenóis, QAC, clorhexidina, halogéneos, iões de cobre e prata e peróxido de hidrogénio, quando empregues em concentrações elevadas, podem provocar coagulação proteica. (LAMBERT, 2004)

**Tabela 2:** Classificação de biocidas segundo o mecanismo de ação no local alvo da célula bacteriana. (GNANADHAS *et al.*, 2013)

Biocides that act on membrane	Biocides that act on proteins	Biocides that act on nucleic acid	Biocides that act on cell wall
QACs [14,133,134]	Alcohols [134]	Alcohols [133]	Alcohols
Biguanides [14,133,134]	Phenols	Acids (parabens) [133]	Phenols [136]
Phenols [14,133,134]	Phenylethers [133]	Antimicrobial dyes [133]	Aldehydes [134,136]
Phenylethers [14,133]	Aldehydes [14,134]	Acridines [14]	Chlorine releasing compounds [136]
Acids [14]	Heavy-metal derivatives [133]	Biguanides [133]	Heavy-metal derivatives (mercurials) [136]
Terpenes [6]	Isothiazolones [133]	Aldehydes [134]	
Alcohols [14,133,134]	Acids (parabens) [133]	Diamidines [135]	
Anilides [134]	Peroxygens [14]	Chlorine compounds [134]	
Peroxygens [134]	Chlorine compounds [14]	Heavy-metal derivatives [133,134]	
Parabens [14]	Biguanides [134]	Peroxygens [134]	
Isothiazolones [14]	Vapor-phase disinfectant [134]	Halogens [134]	
Anionic surfactant [14]		Vapor-phase disinfectant [134]	



## 2. ANTIBIÓTICOS

### 2.1. Perspetiva Histórica: da Antiguidade aos nossos dias

Os compostos antimicrobianos remontam à antiguidade, precedendo em largos milénios a descoberta do primeiro antibiótico. (DURAND *et al.*, 2019)

No seu habitat natural, os microrganismos, de forma a sobreviverem, produzem compostos antimicrobianos. Adicionalmente, desenvolvem mecanismos de resistência quer aos produzidos por outros microrganismos, quer aos produzidos por si próprios, o que justifica que a maioria dos antibióticos provenha de fontes naturais, com grande foco no solo. (DURAND *et al.*, 2019)

O recurso do Homem a substâncias antimicrobianas remonta a civilizações antigas, nomeadamente no Antigo Egito em que se aplicava o pão bolorento no tratamento de feridas e queimaduras. O mesmo pensamento foi partilhado, na Idade Média, pela Grécia, China, Sérvia e Roma. (DURAND *et al.*, 2019; GOULD, 2016) A inibição que uns microrganismos provocavam noutros foi observada ao longo dos tempos por inúmeros investigadores, tais como Joseph Lister e Louis Pasteur, sendo que, em 1889, Jean Paul Vuillemin denominou essa relação por “*antibiosis*”, definindo-a como «...”one living organism kills another to ensure its own existence”». (DURAND *et al.*, 2019)

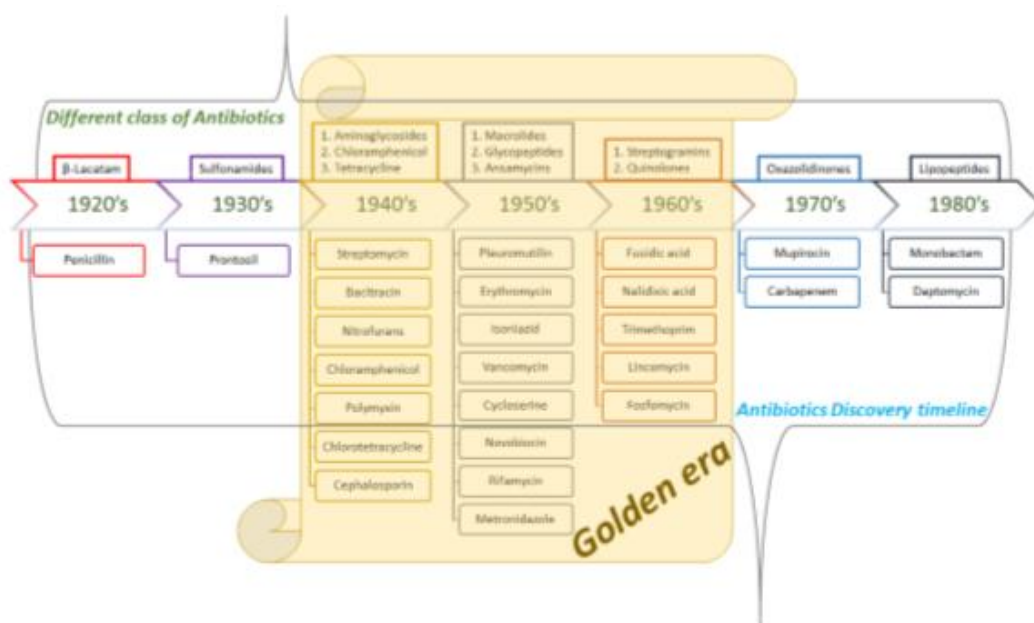
Até 1909, o conhecimento desta relação entre os microrganismos era apenas observacional, já que nenhuma molécula antimicrobiana fora identificada. (DURAND *et al.*, 2019) No entanto, nesse ano, Paul Erlich (GOULD, 2016), inspirado no medicamento *Atoxyl*, sintetizado por Antoine Béchamp em 1859, descobriu a arsfenamina, ativa contra o agente etiológico da sífilis. (AMINOV, 2017; DURAND *et al.*, 2019) Esta molécula foi comercializada sob o nome *Salvarsan*, em 1911. (CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019; GOULD, 2016) Posteriormente, sofreu melhorias ao nível da solubilidade e redução dos efeitos secundários, originando o *Neosalvarsan*. (AMINOV, 2017; CUNHA *et al.*, 2019)

Em 1932, Gerhard Domagk reconheceu a atividade antimicrobiana do *Prontosil*, produzido anteriormente por Josef Klarer e Fritz Mietzsch, sendo comercializado em 1935. Contudo, veio a verificar-se que o efeito antimicrobiano advinha apenas da sulfanilamida. (AMINOV, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; GOULD, 2016)

Um importante marco na História da Medicina Moderna centra-se na descoberta fortuita da penicilina por Sir Alexander Fleming, em 1928. Apesar de alguns percalços, com o auxílio de Howard Florey e Ernest Chain, a penicilina pôde ser então produzida em larga escala em 1945. (AMINOV, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019; GOULD, 2016)

De forma a explorar o antagonismo entre microrganismos, Selman Waksman

desenvolveu, por volta dos anos 40, uma plataforma de *screening* de microrganismos produtores de compostos antimicrobianos, designada como Plataforma de Waksman. Esta plataforma, baseada nas técnicas de cultivo microbiano, visava verificar a atividade antimicrobiana das bactérias do solo, nomeadamente actinobactérias. Esta revelou-se bastante útil e, rapidamente, providenciou a descoberta de vários antimicrobianos, tais como actinomicina, estreptomina e neomicina. Assim, dá-se início à Era do Ouro da Antibioterapia, entre 1940 e 1970, época em que se descobriram várias classes de antibióticos, que ainda hoje assumem um papel preponderante na terapêutica (Figura 2). (CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019)



**Figura 2:** Cronologia da descoberta das diferentes classes de antibióticos. (KARMAKAR E GAITONDE, 2019)

Contudo, cerca dos anos 70, assistiu-se a um decréscimo na descoberta de novos compostos antimicrobianos de origem natural, devido à dificuldade em promover o crescimento de bactérias do solo *in vitro*. (DURAND *et al.*, 2019) Assim, e visando obter mais compostos e com características físico-químicas e/ou farmacológicas aperfeiçoadas, o processo de semissíntese foi entretanto introduzido. (CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019) Este consistia em modificações na estrutura dos compostos obtidos com recurso à Plataforma de Waksman. A aplicação da semissíntese permitiu expandir a classe dos β-lactâmicos, que passou a compreender várias subclasses, nomeadamente a das Penicilinas, obtidas a partir da penicilina G, a das Cefalosporinas, obtidas a partir da Cefalosporina C, entre outras subclasses *minor*. A semissíntese podia ocorrer quer por modificações independentes, caso da estreptomina, da penicilina e da cefalosporina, quer por modificações em série, como é o caso dos macrólidos e das tetraciclina. No caso das modificações

independentes, o ponto de partida era o composto natural; já no caso das modificações em série, o ponto de partida era a última molécula alterada, limitando assim o número de compostos que se podiam obter. (CUNHA *et al.*, 2019)

O recurso à obtenção dos compostos antimicrobianos por síntese total veio permitir a introdução de novas moléculas na terapêutica, como o Cloranfenicol, que foi o antibiótico pioneiro desta nova era, e permitiu a descoberta de mais duas subclasses de antibióticos incluídas nos  $\beta$ -lactâmicos: os carbapenemos e os monobactâmicos. (AMINOV, 2017; CUNHA *et al.*, 2019) Com recurso à síntese *in vitro* obtiveram-se também os nitrofuranos em 1953, as quinolonas em 1960 e as oxazolidinonas em 1987. (CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019)

A última descoberta de uma nova classe de antibióticos ocorreu em 1986, com a descoberta da daptomicina. Atualmente, os antibióticos comercializados vão de encontro às classes já existentes. Algumas estratégias passam por recuperar compostos antimicrobianos, que outrora foram rejeitados ou descontinuados, ou recorrer à combinação de antibióticos novos ou já existentes. (AMINOV, 2017; CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019; GOULD, 2016)

## I) A descoberta de novos compostos

Apesar da descoberta dos variados compostos antimicrobianos durante a Época de Ouro ter sido uma arma poderosa contra as infeções bacterianas, o aumento das infeções por bactérias MDR conduziu à necessidade de obtenção de novas moléculas no início do século XXI. Um dos recursos adotados para responder a esta necessidade foi o *screening* fenotípico, que permitiu observar quais as moléculas capazes de induzir alterações fenotípicas nas bactérias. Adicionalmente a este, as tecnologias ómicas, em que são estudados o genoma, proteínas, lípidos e metabolitos de uma determinada célula, permitem conhecer a fisiologia e o metabolismo celulares, perceber o mecanismo de ação dos compostos antimicrobianos e identificar novos alvos. Outra estratégia passa pelo *screening* baseado no local alvo bacteriano, em que é investigado qual o local alvo essencial à vida da bactéria e que é exclusivamente seu, não estando presente no hospedeiro. Este local é sujeito a um ensaio de *High Throughput Screening* (HTS), de forma a obtermos um composto *lead*, que será otimizado. (CUNHA *et al.*, 2019)

Recentemente, algumas abordagens promissoras têm sido desenvolvidas como a tradução do genoma (*genome mining*) ou *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9* (CRISPR-Cas9). (DURAND *et al.*, 2019) O sistema CRISPR-Cas9, pertencente

ao sistema imune da bactéria, também tem sido aplicado na descoberta de novos compostos antimicrobianos. Os antimicrobianos constituídos por nucleases guiadas por RNA (RGN) têm como alvo sequências específicas do DNA, como por exemplo determinantes de virulência ou de resistência a antimicrobianos. A introdução destas RGN nas bactérias, através de bacteriófagos ou plasmídeos, conduz a clivagens em locais específicos do DNA bacteriano, efetuadas pela proteína Cas9, promovendo a citotoxicidade, redução de genes conferentes de resistência ou virulência, ativação do sistema toxina-antitoxina, diminuição dos efeitos secundários e permitindo uma modulação da população microbiana devido à sua elevada especificidade. (CITORIK *et al.*, 2014)

Adicionalmente, assistiu-se ao renascimento dos métodos de cultura a partir de amostras complexas, o que permitiu a descoberta da teixobactina, um metabolito secundário produzido por espécies de microrganismos de solos, recentemente identificadas. (DURAND *et al.*, 2019; LING *et al.*, 2015)

Estudos de metagenómica relatam que se encontra ainda por explorar uma elevada percentagem de fontes naturais de antibióticos, como sejam plantas ou organismos marinhos, constituindo assim uma opção promissora para descoberta de novos compostos antimicrobianos. (AMINOV, 2017; CUNHA *et al.*, 2019) Assim como o microbiota do Homem, particularmente o intestinal, sendo de referir o da cavidade nasal e vaginal, a partir dos quais se identificaram recentemente a lugdunina e a lactocilina, respetivamente. (CUNHA *et al.*, 2019; DURAND *et al.*, 2019)

É ainda de referir os peptídeos antimicrobianos, parte integrante da imunidade inata de quase todos os organismos e que apresentaram resultados satisfatórios *in vitro*, sendo necessário melhorar as suas características farmacocinéticas, que atualmente limitam o seu alcance clínico. (DURAND *et al.*, 2019)

Outra abordagem referida na literatura científica disponível é a utilização de nanopartículas constituídas por metais, carbono ou polímeros que, devido à sua atividade antimicrobiana, podem ser utilizadas, *per si*, no combate a bactérias patogénicas, ou também poderão ser veículos para as moléculas de antimicrobianos. A utilização de nanopartículas como transportadoras destes compostos possibilita tanto um aumento da eficácia do tratamento, nomeadamente nas infeções intracelulares, como uma diminuição da toxicidade dos mesmos. Esta abordagem permite um aumento da biodisponibilidade e do tempo de semi-vida do antimicrobiano, assim como uma diminuição dos seus efeitos secundários, e ainda a preservação do microbioma humano. (KARMAKAR E GAITONDE, 2019)

## II) Adaptação Bacteriana

As bactérias vivem em comunidade no meio ambiente, meio esse que sofre alterações dos fatores bióticos e abióticos, quer a nível temporal, quer a nível espacial, originando situações de *stress*. (MULLIS *et al.*, 2019) De forma a sobreviver, as bactérias desenvolveram mecanismos de resposta, que conduzirão à sua adaptação, bem como mecanismos de interação entre si. (ABRUDAN *et al.*, 2015; MULLIS *et al.*, 2019; POOLE, 2012)

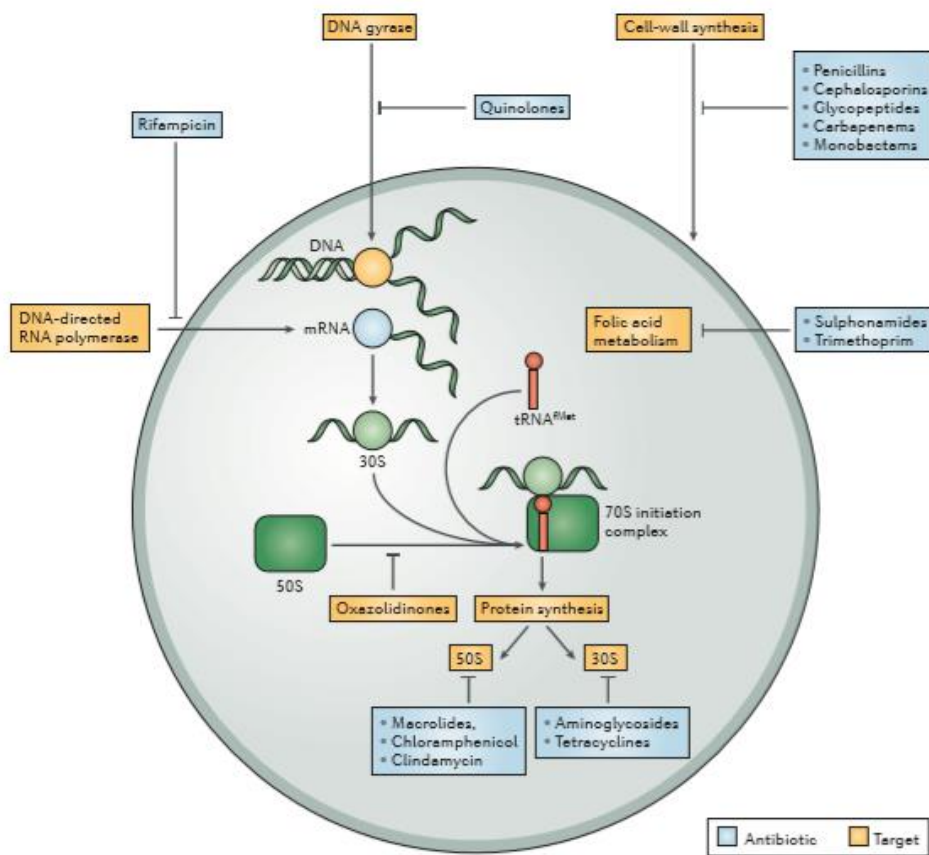
As relações interbacterianas podem ser cooperativas ou antagonistas, existindo evidências de que estas últimas são mais prevalentes. (ABRUDAN *et al.*, 2015) A competição, motivada por disputa de recursos ou espaço, pode ser indireta, através do consumo dos recursos disponíveis, ou direta, recorrendo à produção de compostos antimicrobianos. (MULLIS *et al.*, 2019) Dentro do antagonismo, podemos observar estratégias competitivas, ocorrendo a produção de compostos antimicrobianos, ou estratégias defensivas, ocorrendo a inibição da produção dos mesmos pelos outros microrganismos. Dependendo da disponibilidade de recursos, a comunidade microbiana tem influência na estratégia adotada, potenciando ou suprimindo a produção de compostos antimicrobianos, contribuindo essa supressão para a manutenção da biodiversidade. (ABRUDAN *et al.*, 2015)

O facto de a exposição a compostos antimicrobianos ser um motivo de *stress* conduz ao desenvolvimento de mecanismos de resistência pela própria célula produtora destes compostos, de forma a proteger-se da toxicidade dos mesmos. (POOLE, 2012)

A presença de compostos antimicrobianos pode tornar as células tolerantes ou resistentes ou induzir dormência. Assim, os microrganismos expostos a estes compostos podem adaptar-se, desenvolvendo mecanismos de resistência como forma de defesa, que poderá resultar na seleção de estirpes resistentes, (MULLIS *et al.*, 2019) podendo ainda promover a HGT, e contribuir para a disseminação de bactérias resistentes. (POOLE, 2012)

### 2.2. Classes e Mecanismos de Ação

Os antibióticos encontram-se divididos em diferentes classes, sendo que cada uma apresenta um alvo bacteriano (Figura 3). (SOUSA, 2006) Assim, os antibióticos estão classificados em antiparietais, antimembranares, inibidores da síntese proteica, inibidores da síntese de ácidos nucleicos, antimetabolitos, nitrofuranos, antituberculosos e antilepra, sendo que a sua ação pode ser bacteriostática ou bactericida. (KAPOOR *et al.*, 2017; KARMAKAR E GAITONDE, 2019; MULLIS *et al.*, 2019; SOUSA, 2006)



**Figura 3:** Alvos bacterianos de diferentes classes de antibióticos (ANEXO II). (LEWIS, 2013)

Os antibióticos antiparietais atuam ao nível de uma das três fases da síntese do peptidoglicano (citoplasmática, membrana ou parietal), provocando a lise celular. Quer as bactérias de Gram-positivo, quer as de Gram-negativo possuem peptidoglicano, todavia esta macromolécula assume percentagens muito superiores nas bactérias de Gram-positivo comparativamente às de Gram-negativo, que apresentam uma estrutura mais complexa. (SOUSA, 2006) Para manter a coesão do peptidoglicano, as ligações cruzadas assumem um importante papel. (KAPOOR *et al.*, 2017) Para tal, é fundamental o uso de uma transpeptidase (DOWLING *et al.*, 2017), proteína de ligação à penicilina (PBP), que se liga à porção D-alanil D-alanina. As PBPs constituem o alvo dos β-lactâmicos, que devem a sua atividade ao anel β-lactâmico. (KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) Alguns antibióticos, derivados da penicilina, cefalosporinas, carbapenemos ou monobactâmicos (DOWLING *et al.*, 2017), mimetizam o dipéptido mencionado, ligando-se às PBPs e impedindo que estas sejam utilizadas na síntese do peptidoglicano e, conseqüentemente, da parede celular. (kapoor *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) É de referir que as PBPs são, habitualmente, específicas de cada espécie bacteriana (v.g. *Staphylococcus aureus*: 4 PBPs - PBPI, PBP2, PBP3 e PBP4; *Escherichia coli*: 7 PBPs - PBPIA/IB/ 2/ 3/ 4/ 5/ 6). (SOUSA, 2006)

Tal como os  $\beta$ -lactâmicos, também os glicopeptídeos atuam na inibição da síntese da parede celular ao ligarem-se ao dipéptido D-alanil D-alanina, impedindo que este interaja com a PBP e, conseqüentemente, não ocorre ligação cruzada. (CUNHA *et al.*, 2019; KAPOOR *et al.*, 2017) Este grupo de antibióticos, todavia, atuam especificamente em bactérias Gram-positivo, já que o seu peso molecular impede que estes atravessem a membrana externa das bactérias de Gram-negativo. (SOUSA, 2006)

A membrana citoplasmática também constitui um alvo bacteriano, nomeadamente das polimixinas, antibióticos antimembranares constituídos por um anel polipeptídico ligado através de uma ligação amida a uma cadeia de ácido gordo. No caso das bactérias de Gram-negativo, em primeira instância, o anel interage com o lipopolissacárido (LPS) presente na membrana externa, deslocando os iões de cálcio e os de magnésio, o que permite a penetração através da membrana. Atingida a membrana citoplasmática, o anel polipeptídico policatiónico liga-se através de ligações eletrostáticas às cargas negativas dos grupos fosfato dos fosfolípidos, enquanto a cadeia de ácido gordo penetra por entre os ácidos gordos dos fosfolípidos presentes na zona hidrofóbica da membrana. Estas interações afetam a permeabilidade membranar, conduzindo ao efluxo de iões potássio, aminoácidos e nucleótidos, culminando na morte celular. (SOUSA, 2006)

Os aminoglicosídeos, por sua vez, atuam inibindo a síntese proteica, sendo o seu alvo a subunidade ribossomal 30S. (CUNHA *et al.*, 2019; KAPOOR *et al.*, 2017) Como possuem carga positiva, ligam-se à membrana externa das bactérias, que possui carga negativa, formando poros que facilitam a sua penetração na célula. Para atravessar a membrana citoplasmática recorrem ao transporte ativo, (KAPOOR *et al.*, 2017) razão pela qual a sua ação é proeminente nas bactérias aeróbicas. Alcançado o citoplasma, estes compostos vão ligar-se à porção 16S do RNA ribossómico (rRNA), prejudicando a leitura dos codões e impedindo a síntese de proteínas. (KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) Tendo em conta as barreiras que os aminoglicosídeos necessitam de ultrapassar, a sua ação sinérgica com os inibidores da síntese da parede celular é uma mais-valia. (KAPOOR *et al.*, 2017)

Assim como nos aminoglicosídeos, o alvo das tetraciclinas também é a porção 16S do rRNA, (KAPOOR *et al.*, 2017) presente na subunidade ribossomal 30S. (CUNHA *et al.*, 2019; KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) Ao interagirem com essa porção, as tetraciclinas impedem a ligação do ácido ribonucleico de transferência (tRNA) ao local A do ribossoma, interrompendo a síntese proteica. (KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017)

O cloranfenicol é também um inibidor da síntese proteica, atuando na subunidade 50S. (CUNHA *et al.*, 2019; KAPOOR *et al.*, 2017) Este antibiótico interage reversivelmente (CUNHA *et al.*, 2019) com a cavidade da peptidiltransferase, na porção 23S do rRNA,

impedindo a ligação do tRNA ao local A do ribossoma e inibindo a transpeptidase. (KAPOOR *et al.*, 2017; SOUSA, 2006)

Na subunidade 50S atuam também os macrólidos, as estreptograminas e as lincosamidas, que apresentam modos de ação semelhantes. Estes antibióticos interrompem a síntese proteica ao bloquear o local P, interferindo na transpeptidação e na translocação. (KAPOOR *et al.*, 2017; SOUSA, 2006)

As oxazolidinonas inibem a síntese proteica por diversas vias, podendo ligar-se à porção 23S do rRNA presente na subunidade 50S e inibir a formação do complexo 70S ou ligar-se ao peptidil-tRNA. (KAPOOR *et al.*, 2017; SOUSA, 2006)

Por modificação química das quinolonas foram obtidas as fluoroquinolonas, (CUNHA *et al.*, 2019) antibióticos inibidores da síntese de ácidos nucleicos cujos alvos são as enzimas topoisomerase II/DNA girase no caso das bactérias de Gram-negativo, e a topoisomerase IV no caso das bactérias de Gram-positivo, culminando na morte celular. A DNA girase é responsável por inserir superenrolamentos negativos no DNA, contribuindo para a sua estrutura condensada. (KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) As quinolonas vão ligar-se à DNA girase, formando um complexo DNA girase-quinolona-DNA, que inibirá a enzima e conduzirá a um descontrolo celular e consequente morte celular. (CUNHA *et al.*, 2019; KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017)

As sulfonamidas e os derivados de diaminopirimidina, nomeadamente o trimetoprim, pertencentes à classe dos antimetabolitos, atuam no metabolismo do ácido fólico, de forma sinérgica, porém diferente, (KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) comprometendo a divisão celular. (DOWLING *et al.*, 2017) Enquanto as sulfonamidas inibem competitivamente a di-hidropteroato sintase, bloqueando a formação de ácido di-hidrofólico, o trimetoprim inibe a di-hidrofolato redutase, impedindo a formação do ácido tetra-hidrofólico, (KAPOOR *et al.*, 2017; DOWLING *et al.*, 2017) a forma ativa do ácido fólico. (DOWLING *et al.*, 2017)

Os nitrofuranos, por sua vez, apresentam um mecanismo de ação multifatorial, ao interferir com a síntese das proteínas, dos ácidos nucleicos e da parede celular, assim como interferência no metabolismo dos hidratos de carbono (através da inibição da acetilcoenzima A). A sua ação antimicrobiana decorre da sua redução, pelas flavoproteínas bacterianas, a compostos intermediários, que alteram macromoléculas celulares, nomeadamente as proteínas ribossomais. (SOUSA, 2006)

A falta de investimento da Indústria Farmacêutica na pesquisa de novas moléculas de antibióticos e o surgimento e disseminação de bactérias MDR colocou a saúde pública mundial em sério risco devido à falta de alternativas terapêuticas para o tratamento de infeções provocadas por bactérias MDR ou, em situações ainda mais graves, infeções por bactérias Pan-



resistentes (PDR). Neste contexto global, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma lista de agentes patogênicos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas de antibióticos eficazes para estas estirpes. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

### **3. PARTILHA DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ENTRE BIOCIDAS E ANTIBIÓTICOS**

A produção de compostos antimicrobianos por microrganismos presentes no solo levou a que as bactérias aí presentes possuíssem mecanismos de resistência quer aos seus próprios compostos, quer aos compostos produzidos pelos restantes microrganismos, surgindo um “resistoma ambiental” que, segundo evidências, poderá ter servido de promotor para a transferência de genes de resistência a antibióticos (ARG). (JUTKINA *ET AL.*, 2018; MUNITA E ARIAS, 2016)

Com a descoberta das várias classes de antibióticos, estes começaram a ser utilizados na prática clínica não só na terapêutica, mas também na profilaxia de infeções. (DURAND *et al.*, 2019) A título de exemplo, em 2018, a nível nacional e europeu, os antimicrobianos mais prescritos em ambulatório foram os  $\beta$ -lactâmicos, seguidos dos macrólidos, lincosamidas e estreptograminas. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019a) No entanto, o uso cada vez mais recorrente de antibióticos, muitas vezes de forma errada, incrementa a exposição das bactérias a concentrações subinibitórias destes compostos, conduzindo à ativação de respostas bacterianas ao *stress* imposto, culminando no desenvolvimento de mecanismos de resistência. (JUTKINA *et al.*, 2018) Um desses mecanismos é a inativação enzimática dos antibióticos, como por exemplo a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, que inativam os  $\beta$ -lactâmicos. Existe uma enorme diversidade destas enzimas, sendo que o destaque vai para as metalo- $\beta$ -lactamases, que apresentam um espectro de ação muito alargado. Outros mecanismos passam por mutações génicas, aumento da expressão de bombas de efluxo, modificação ou proteção do local alvo bacteriano, diminuição da permeabilidade membranar através da diminuição da produção de porinas, assim como formação de biofilmes. (MUNITA E ARIAS, 2016)

Adicionalmente, a resposta ao *stress* provocado por alterações dos fatores de crescimento pode desencadear mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos, uma vez que implica o recrutamento de determinantes de resistência, promovendo a alteração da expressão génica, assim como da fisiologia celular. Deste modo, podem ocorrer alterações nos locais alvo bacterianos, assim como a formação de biofilmes. (POOLE, 2012)

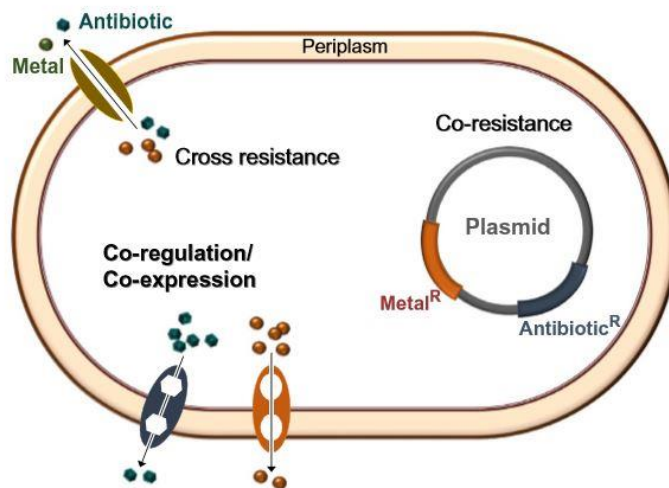
O surgimento e a disseminação da resistência bacteriana aos antimicrobianos podem ser influenciados por uma prescrição e/ou uso incorretos destes compostos, pelo seu uso em larga escala na agricultura e pecuária, pela menor literacia em saúde da população, por um aumento dos doentes imunodeprimidos, pela globalização e por um decréscimo na descoberta de novos antibióticos. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

Além de desenvolverem os seus próprios mecanismos de resistência, as bactérias também podem adquirir determinantes de resistências através da captação ou transferência de DNA exógeno, fenómeno para o qual contribuem os biocidas. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018; SCENIHR, 2009)

Os biocidas são compostos antimicrobianos cujo uso remonta à Antiguidade, sendo que as bactérias foram expostas aos mesmos antes da ação antropogénica. (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006) Assim, e apesar da resistência a biocidas não ser tão comum quando comparada com a resistência aos antibióticos, o que pode ser justificado por os biocidas atuarem em diversos locais alvo bacterianos simultaneamente, as bactérias desenvolveram, também ao longo dos anos, resistência a estes compostos. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018; GNANADHAS *et al.*, 2013)

Atualmente, a utilização de biocidas é muito frequente, ampla e de forma pouco controlada, levando à sua acumulação no ecossistema. (BAKER-AUSTIN *ET AL.*, 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2018) Um exemplo são os metais que, devido à sua persistência no ambiente, permanecem e acumulam-se nos solos e águas, constituindo assim um fator de *stress* para as bactérias, que em resposta à sua presença expressam mecanismos de resistência a estes compostos. Estes, ao exercerem uma pressão seletiva nas estirpes bacterianas resistentes a estas moléculas, favorecem a sua proliferação em detrimento das suscetíveis. (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006) Também a presença de concentrações subinibitórias de biocidas, por exemplo em águas residuais, contribui para a seleção de bactérias resistentes aos biocidas presentes nesses nichos ambientais. (PAUL *et al.*, 2019)

Como mencionado anteriormente, vários estudos realizados demonstraram que o uso de biocidas pode contribuir para a disseminação de ARG e co-seleção de estirpes bacterianas resistentes, que pode ocorrer por co-resistência, resistência cruzada ou mecanismos co-regulatórios (Figura 4). (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; JUTKINA *et al.*, 2018; PAL *et al.*, 2017)



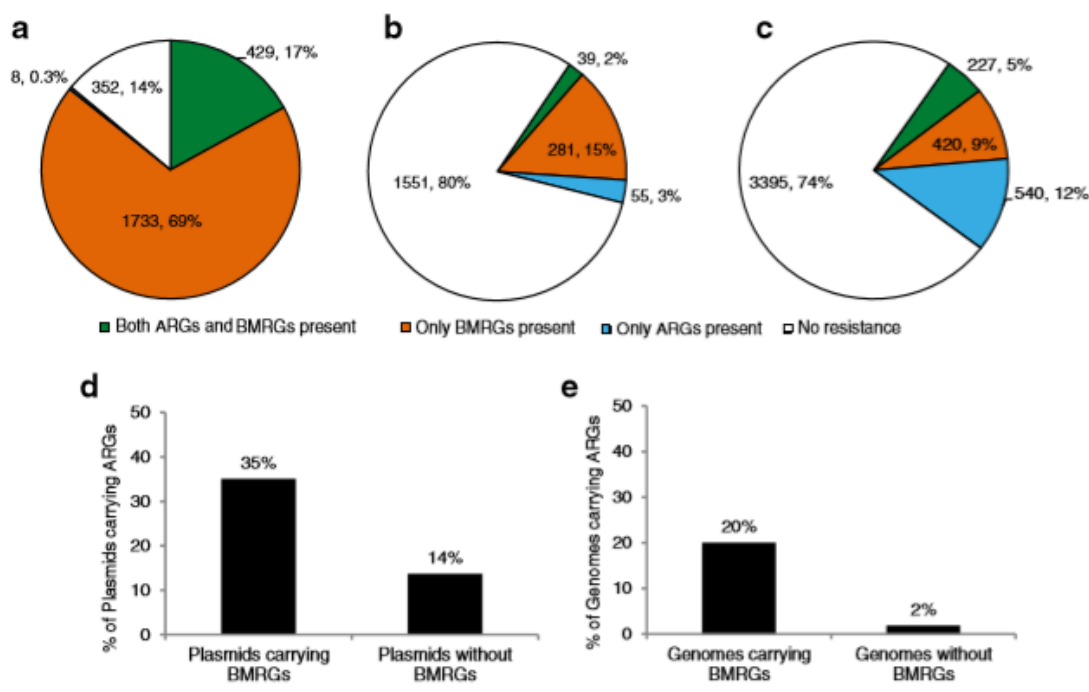
**Figura 4:** Mecanismos de co-seleção de bactérias resistentes a biocidas e a antibióticos: resistência cruzada, co-resistência e co-regulação (ANEXO III). (PAL *et al.*, 2017)

Os mecanismos co-regulatórios consistem na regulação da expressão de um determinado conjunto de genes, sendo que um gene de resistência a biocidas/metais (BMRG) e um ARG podem estar sob influência de um mesmo gene regulador. Assim, a ativação da expressão de um gene pode ter influência na ativação da expressão do outro. (PAL *et al.*, 2017) É o caso da proteína reguladora CzcS, responsável pela resistência simultânea ao imipenemo e ao zinco em *Pseudomonas aeruginosa*, constituindo um exemplo de co-regulação. (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; JUTKINA *et al.*, 2018; PAL *et al.*, 2017)

No caso da co-resistência, os genes que codificam a resistência aos biocidas e antibióticos encontram-se simultaneamente localizados na mesma célula. Quando localizados num mesmo MGE, este é transferido de uma célula dadora para uma célula recetora, e esta última adquire quer o gene de resistência ao antibiótico, quer ao biocida. (PAL *et al.*, 2017) Assim, espera-se que uma pressão seletiva que mantenha BMRG nas bactérias vá contribuir para uma maior abundância e permanência de ARG (Figura 5). (PAL *et al.*, 2015) Exemplos de co-resistência são descritos em *Enterococcus* spp. em vários estudos em que se observou a transferência simultânea dos genes *tcrB* e/ou *CueO* (genes que codificam a resistência ao cobre) com genes de resistência a diferentes antibióticos: eritromicina, tetraciclina, vancomicina, estreptomicina, gentamicina e ampicilina (genes: *ermB*; *tetL*, *tetM*; *vanA*; *aadE*; *aac* (6')-*le-aph* (2'')-*la*; *pbp5*, respetivamente). (AMACHAWADI *et al.*, 2013; BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2013)

No caso da resistência cruzada, o mecanismo utilizado pelas bactérias é comum a diversos antimicrobianos. Assim, ao ocorrer transmissão de genes que codificam esse mecanismo, a bactéria recetora adquire resistência aos diversos compostos. (PAL *et al.*, 2017)

Um exemplo são os genes *qacA*, *qacB* e *smr*, que codificam bombas de efluxo, e conferem resistência aos compostos de amônio quaternário, assim como conduzem a uma diminuição da suscetibilidade de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina (MRSA) à cloro-hexidina. (PAUL *et al.*, 2019)



**Figura 5:** Percentagem de ARGs e/ou BMRGs inscritos em genomas e plasmídeos. Perfil genotípico de resistência: a) 2522 genomas; b) 1926 plasmídeos que se encontram inscritos nos 2522 genomas descritos em a); c) 4582 plasmídeos; d) plasmídeos portadores de ARGs com ou sem BMRGs no mesmo plasmídeo; e) genomas portadores de ARGs com ou sem BMRGs no mesmo genoma. (PAL *et al.*, 2015)

Ambientes como o solo e a água apresentam uma elevada biodiversidade de microrganismos, assim como em antibióticos e biocidas em concentrações subinibitórias. Tendo em conta estes fatores, alguns estudos realizados reportam que a transmissão persistente de determinantes de resistência a antimicrobianos (AMR) é devida à co-localização dos genes de resistência. (PAUL *et al.*, 2019) Não só o meio ambiente, mas também o microbiota do Homem e dos animais são suscetíveis à transferência de genes de resistência, sendo de referir a sua possível colonização por bactérias patogénicas. Outro ambiente preocupante é a pecuária, em que os metais são utilizados como adjuvantes na promoção do crescimento, promovendo a resistência a esses compostos e simultaneamente aos antibióticos. (JUTKINA *et al.*, 2018; PAL *et al.*, 2017)

A transmissão da informação genética entre as bactérias ocorre através de HGT, com o auxílio dos MGE. (PAUL *et al.*, 2019) Este mecanismo de resistência adquirida implica um gasto de energia menor do que a ocorrência de mutações cromossomais. (PAL *et al.*, 2017)

### 3.1. Transferência Horizontal de Genes

As bactérias adquirem e transmitem genes de forma natural quer no meio ambiente, quer no microbiota do Homem e dos animais, quer em ambiente hospitalar. Esta HGT possibilita que as bactérias, quando sujeitas a fatores de stress como a exposição a concentrações subinibitórias de antimicrobianos, adquiram material genético, nomeadamente genes de resistência, que lhes permite sobreviver. (JUTKINA *et al.*, 2018; LERMINIAUX E CAMERON, 2019) Segundo estudos realizados, a HGT pode ser estimulada pela exposição das bactérias a determinados antimicrobianos, como antibióticos, QAC, clorohexidina, triclosan, etanol, cloro, cloramina, peróxido de hidrogénio, prata, mercúrio, zinco, cádmio, níquel e pesticidas. (JUTKINA *et al.*, 2018; PAL *et al.*, 2015, 2017; PAUL *et al.*, 2019)

Os genes que conferem resistência a estes compostos podem continuamente ser transferidos entre bactérias, que se disseminam e têm a capacidade de os acumular, dando origem a bactérias MDR, cuja disseminação é promovida por MGE. (PAUL *et al.*, 2019)

A HGT pode ocorrer através de três mecanismos: conjugação, transdução e transformação. (MUNITA E ARIAS, 2016; PAUL *et al.*, 2019) O mecanismo usado pode depender do tempo e espaço. A conjugação ocorre quando as bactérias estão no mesmo ambiente, já a transdução permite proteger o DNA dentro do bacteriófago e, portanto, pode ocorrer em tempos e espaços distintos. No caso da transformação, também não há necessidade de contacto entre as bactérias, no entanto o DNA não se encontra protegido, sendo degradado mais facilmente. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019)

#### I) Conjugação

A conjugação é o mecanismo de HGT mais comum. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019; PAL *et al.*, 2017) Neste processo, as bactérias encontram-se no mesmo ambiente e é requisito obrigatório que haja contacto entre as células dadora e recetora, ocorrendo a transferência, por exemplo, de plasmídeos conjugativos (elementos genéticos extracromossomais). A conjugação tem um papel fundamental na disseminação dos ARG. O transporte dos ARG por plasmídeos é uma situação vantajosa para ambos, visto que os genes podem ser transferidos entre a comunidade bacteriana, enquanto os plasmídeos são mantidos na bactéria, já que lhe conferem características de sobrevivência. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019)

Estudos reportam que a transferência de plasmídeos entre bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae* aumentou após exposição a antibióticos, levando a crer que estes atuam como moléculas químicas sinalizadoras para a transcrição de genes de

virulência, reparação de DNA e transferência de DNA. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019)  
Estudos realizados em ambiente marinho contaminado com metais e antibióticos demonstraram a presença de elevadas percentagens de isolados resistentes a ambos os compostos, assim como de plasmídeos conjugativos portadores desses genes, sendo a HGT um evento preponderante na disseminação destes determinantes de resistência. (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006)

## II) Transdução

A transdução implica a transferência de DNA bacteriano através de partículas virais que infetam bactérias – os bacteriófagos. Estes têm a capacidade de se ligarem a uma bactéria recetora e libertarem o DNA que transportam. Posteriormente esse DNA é recombinado no genoma da bactéria recetora. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019)

A transdução pode ocorrer quer no caso de genes inscritos em plasmídeos, quer no caso de genes inscritos no cromossoma, embora seja mais rápida neste último. Um exemplo de bactérias que recorrem à transdução são as estirpes MRSA, pois estudos *in vitro* demonstraram ser possível a transferência de ARG a partir de estirpes envolvidas em infeções hospitalares para estirpes laboratoriais suscetíveis; o mesmo foi observado em estirpes de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019)

## III) Transformação

A transformação ocorre quando uma bactéria capta DNA livre e ocorre recombinação no seu genoma. Para que estes processos ocorram é necessário que a bactéria expresse genes para a captação e ligação ao DNA. *Acinetobacter* spp., *Haemophilus* spp., *Neisseria* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. são exemplos de géneros bacterianos dotados desta capacidade, assim como *Helicobacter pylori*. (LERMINIAUX E CAMERON, 2019)

### 3.2. Elementos Genéticos Movéis

A pressão seletiva a que os microrganismos são sujeitos devido à exposição a antibióticos e biocidas obriga a que estes capturem e mantenham genes de resistência a estes compostos. Um exemplo é o microbiota humano, em que as bactérias residentes adquirem genes de resistência e mantêm-nos mesmo na ausência de antibióticos, o que pode promover a aquisição de ARG por bactérias patogénicas, através de eventos de HGT. Para mediar esta transferência, os MGE têm um papel fundamental. (JANSEN E AKTIPIS, 2014)

Os MGE são sequências de DNA que podem promover a transferência de DNA do cromossoma para plasmídeos, ou entre plasmídeos, sequências de inserção (IS), transposões (Tn), cassetes de genes e integrões (Int), ou podem ser transferidos entre bactérias de Gram-positivo e/ou Gram-negativo (plasmídeos conjugativos ou outros elementos conjugativos integrativos (ICE)), podendo transportar ARG, BMRG, assim como genes de virulência. Apesar das diferenças entre si, os vários MGE atuam em sinergia, conferindo às bactérias um poder adaptativo. (PARTRIDGE *et al.*, 2018)

As IS são elementos genéticos pequenos que codificam transposases, promovendo a transposição. Alguns estudos indicam que a mobilização das IS pode acarretar algumas consequências, como a transferência de genes de resistência em regiões adjacentes às IS, a transferência de promotores ou a inserção num local do genoma que influencie a expressão de ARG. (PARTRIDGE *et al.*, 2018)

Os Tn são elementos ligeiramente maiores que as IS, com capacidade para transportarem ARG ou BMRG; é o caso de alguns transposões das famílias Tn3 (Tn1546: portador do gene *vanA*) e Tn7 (Tn552: portador do gene *blaZ*), associados a bactérias de interesse clínico. (PARTRIDGE *et al.*, 2018)

As cassetes de genes são pequenos MGE constituídos por um único gene, ou ocasionalmente dois genes, caracterizando-se por serem elementos não replicativos, encontrados habitualmente inseridos em Int. Estes podem conter várias cassetes de genes portadoras de ARG, conferindo às bactérias que os transportam um perfil de multirresistência. (BAKER-AUSTIN *et al.*, 2006; PARTRIDGE *et al.*, 2018) Das várias classes de Int, a classe I foi a primeira reportada e é a mais comumente relacionada com resistência a antibióticos em isolados clínicos. (PARTRIDGE *et al.*, 2018)

Os plasmídeos são importantes veículos de transporte quer de ARG, quer de MGE (IS, Tn, Int), conferindo vantagem à célula hospedeira e ao próprio plasmídeo. A transferência de plasmídeos sem capacidade replicativa nas células hospedeiras é promovida por outros MGE (v.g. IS, Tn e In), que são essenciais à sua mobilidade intracelular e persistência de genes de resistências que albergam. Os plasmídeos podem transferir-se por transferência vertical ou transferência horizontal. Neste último caso, em que possuem capacidade de se disseminar autonomamente, são designados de plasmídeos conjugativos. (PARTRIDGE *et al.*, 2018)

Tal como os plasmídeos, os ICE também se mobilizam de forma autónoma entre bactérias, sendo incorporados no seu genoma e replicados com este. Esta parte do genoma que é adquirida horizontalmente é conhecida por Ilha Genómica. Não obstante, também já foram identificados ICE excisados, que possuíam capacidade de replicação. Estes ICE também

podem abrigar outros MGE, tais como cassetes de genes inseridas em Int que, por sua vez, estão inseridos em Tn. (PARTRIDGE *et al.*, 2018)

Os genes de resistência transportados em MGE tornam-se mais preocupantes que os cromossomais, já que os MGE se replicam com maior rapidez e contactam com uma grande variedade de genomas, o que lhes permite acumular vários genes de resistência. (JANSEN E AKTIPIIS, 2014)

Uma possível abordagem contra a AMR consiste em desenvolver antimicrobianos cujo alvo seja os MGE ou os mecanismos de HGT. (JANSEN E AKTIPIIS, 2014)

## **4. BACTÉRIAS PAN-RESISTENTES – A AMEAÇA GLOBAL DO SÉCULO XXI?**

### **4.1. Atualidade nacional e internacional**

A AMR constitui uma ameaça global à saúde pública mundial, tendo associadas elevadas taxas de mortalidade e morbidade e, conseqüentemente, elevados gastos em saúde. A AMR foi e é observada quer em infeções associadas a ambiente hospitalar, quer em infeções adquiridas na comunidade. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

Tendo em consideração as taxas de mortalidade e transmissibilidade, impacto nos sistemas de saúde, comunidade e economia, associadas à escassez de alternativas terapêuticas disponíveis, a OMS, em consenso com outras entidades internacionais, publicou uma listagem de estirpes de bactérias prioritárias para a descoberta urgente de novas moléculas eficazes (Tabela 3). (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)



**Tabela 3:** Lista dos patogénios cujo desenvolvimento de novos antibióticos é prioritário, segundo a OMS. (Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

PRIORIDADE	ESTIRPES BACTERIANAS	PERFIL DE RESISTÊNCIA
<b>PRIORIDADE GLOBAL</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Isoniazida, rifampicina, fluoroquinolonas
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenemos
<b>PRIORIDADE CRÍTICA</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemos
	Enterobacteriaceae	Carbapenemos, cefalosporinas de 3ª geração
	<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<b>PRIORIDADE ALTA</b>	<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
	<i>Salmonella</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Vancomicina, meticilina
	<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolonas
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas de 3ª geração, fluoroquinolonas
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicilina
<b>PRIORIDADE MÉDIA</b>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
	<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolonas

Devido à forte preocupação relativamente à situação atual, o perfil de MDR de estirpes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecium* foi alvo de ações de monitorização levadas a cabo por cada país europeu, sendo os dados obtidos comunicadas ao Centro Europeu de Controlo e Prevenção da Doença (ECDC). (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

No caso da *E. coli*, os relatórios indicaram que mais de 50% dos isolados eram resistentes a pelo menos um grupo de antimicrobianos, sendo comum a resistência a múltiplos grupos. Uma preocupação adicional é o facto de mais de metade das infeções por estirpes de *E. coli* MDR ocorrerem na comunidade. À semelhança de *E. coli*, mais de metade dos isolados de *Acinetobacter* spp. apresentavam resistência a pelo menos um grupo de antimicrobianos. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019)

No caso da *K. pneumoniae*, os relatórios indicaram que mais de 1/3 dos isolados eram resistentes a pelo menos um grupo de antimicrobianos, sendo que a resistência a múltiplos grupos era o mais comum. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND

CONTROL, 2019b)

Já no caso da *P. aeruginosa*, os relatórios indicaram que mais de 32.1% dos isolados eram resistentes a pelo menos um grupo de antimicrobianos, sendo também comum a resistência a múltiplos grupos. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

Por sua vez, *S. pneumoniae* não apresenta alterações dos níveis de resistência no período estudado (2015-2018). (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

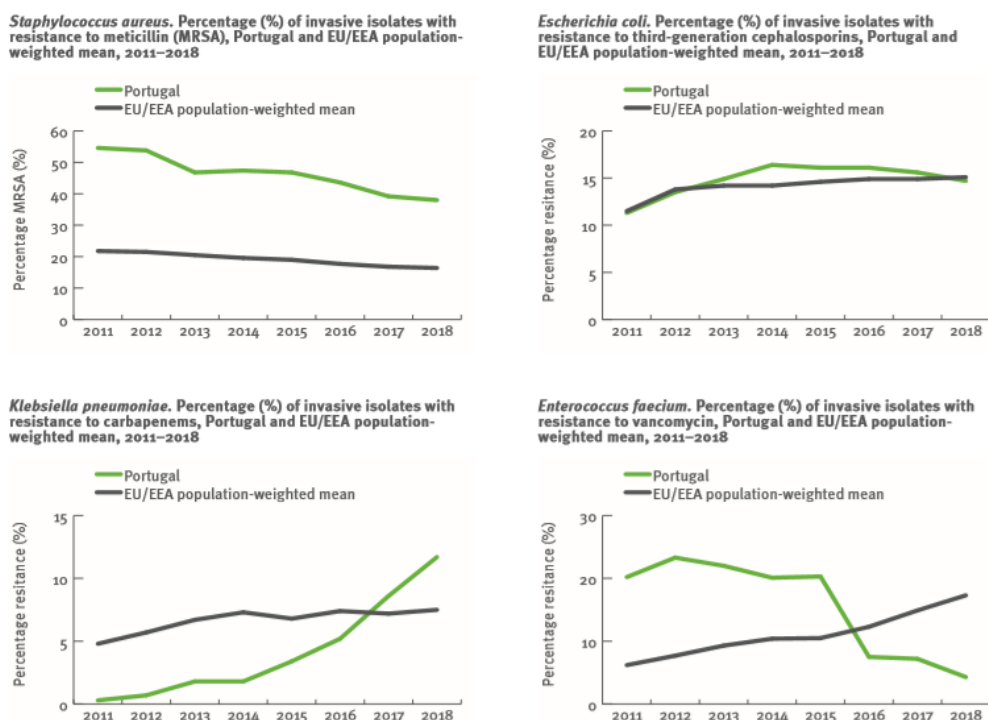
Contrariamente ao descrito anteriormente, estirpes MRSA apresentam uma tendência decrescente nas taxas de resistência entre 2015 e 2018. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

Relativamente a *Enterococcus* spp., particularmente *E. faecium*, a resistência à vancomicina tem aumentado de forma rápida e contínua e, ao contrário dos outros patogénios, em que o sul da Europa era mais fustigado, as estirpes VRE (*Enterococcus* resistentes à vancomicina) estão distribuídas homoganeamente pela Europa. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

A resistência aos carbapenemos é uma situação que exige um controlo apertado visto que estes pertencem a um subgrupo de  $\beta$ -lactâmicos de uso exclusivo hospitalar e as enzimas que os inibem, as carbapenemasas, são codificadas por genes localizados em plasmídeos que podem ser transferidos entre as várias bactérias. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

Perante os dados reportados, pode verificar-se que a resistência a vários antimicrobianos em simultâneo é um padrão comum, o que restringe as alternativas terapêuticas atualmente disponíveis. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b) A acumulação de ARG e a sua disseminação através de MGE tem conduzido ao aumento exponencial da percentagem de isolados PDR, que limitam totalmente a eficácia das alternativas terapêuticas atualmente disponíveis. As estirpes PDR, nomeadamente de *K. pneumoniae*, *A. Baumannii* e *P. aeruginosa*, encontram-se associadas a elevadas taxas de mortalidade a nível mundial. Apesar de também serem passíveis de transmissão comunitária, estas estirpes foram encontradas maioritariamente em Unidades de Cuidados Intensivos. (KARAKONSTANTIS *et al.*, 2019) A nível nacional, segundo os dados fornecidos pelo ECDC, Portugal segue as tendências de aumento e diminuição de AMR observados na Europa, todavia apresenta alguma discrepância no caso de estirpes de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenemos e de estirpes de *E. faecium* resistentes à vancomicina. No primeiro caso, contrariamente à União Europeia, Portugal apresenta um incremento

acentuado dos níveis de resistência; já no segundo caso, Portugal apresenta um decréscimo dos níveis de resistência, o que contraria a tendência europeia (Figura 6). (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)



**Figura 6:** Dados comparativos entre Portugal e EU de níveis de resistência de estirpes MRSA à meticilina, *E. coli* às cefalosporinas de 3ª geração, *K. pneumoniae* aos carbapenemos e *E. faecium* à vancomicina. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

#### 4.2. Perspetivas futuras

A AMR é principalmente induzida pelo uso intensivo de antimicrobianos, que exercem uma pressão seletiva nos microrganismos, selecionando os que são resistentes. A sua transmissão entre Homem, animais e ambiente encontra-se descrita na literatura científica. Assim, é imprescindível o controlo do uso dos antimicrobianos, assim como a prevenção da transmissão de doenças infecciosas, objetivos para os quais é necessária uma colaboração a nível global num conceito *One Health*. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

A nível europeu, as forças políticas reconheceram e reconhecem a necessidade urgente de travar este problema de saúde pública. Assim, a Comissão Europeia elaborou um plano de ação de combate à AMR – European One Health Action Plan against AMR – em 2017. Adicionalmente, foi desenvolvido um sistema de vigilância da AMR – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) - que conta com a participação dos Estados-

Membros e países do Espaço Económico Europeu na recolha, análise e elaboração de relatórios relativos aos dados nacionais de AMR. Dados obtidos com recurso a este sistema são fornecidos à OMS, de modo a integrarem o WHO Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) inserido na WHO Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2019b)

Os relatórios fornecidos pelos diversos países possibilitam uma análise global do estado da AMR, permitindo tomar ações consistentes, como por exemplo a elaboração da lista de prioritização de bactérias que inspiram uma imensa preocupação, incentivando a Indústria Farmacêutica a pesquisar e desenvolver novas moléculas com atividade terapêutica eficaz, que permitam reverter esta situação de imensa gravidade mundial. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017)

## CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Os biocidas são uma importante ferramenta no controlo do crescimento de microrganismos indesejáveis. Contudo, devido ao seu vasto uso, particularmente em concentrações subinibitórias, podem contribuir para a disseminação exponencial de bactérias portadoras de MGE que albergam ARG. A pressão seletiva destes compostos exercida sobre os microrganismos resulta na co-seleção de bactérias MDR e PDR a antibióticos. Para o impedir, deve ser investigado o potencial co-seletivo dos biocidas mais utilizados.

Devido à sua ampla ação, estes compostos são empregues nas diversas áreas, todavia sem vigilância. Assim, torna-se imperativo que haja um controlo das quantidades produzidas e consumidas, com que finalidade e em que concentração.

Adicionalmente, devem ser estudadas as CMI de cada biocida, de forma a que o seu uso não promova resistências. A nível ambiental, devem ser tomadas medidas de prevenção da acumulação destes resíduos ou derivados no meio ambiente, nomeadamente solo e água.

Para acompanhar a evolução da resistência a antibióticos, devem ser elaborados relatórios globais sobre a sua incidência e prevalência, que permitirão às Autoridades de Saúde analisar o panorama e atuar em conformidade e de forma mais assertiva.

Em suma, esta possível relação entre o uso de biocidas e o seu contributo para a seleção de bactérias MDR e PDR a antibióticos é corroborada por diversos estudos, porém são necessários mais dados, assim como a realização de estudos *in situ*.

## BIBLIOGRAFIA

ABRUDAN, M.I., SMAKMAN, F., GRIMBERGEN, A.J., WESTHOFF, S., MILLER, E.L., WEZEL, G.P., ROZEN, D.E. - Socially mediated induction and suppression of antibiosis during bacterial coexistence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 35 (2015), 11054–11059.

AMACHAWADI, R.G., SCOTT, H.M., ALVARADO, C.A., MAININI, T.R., VINASCO, J., DROUILLARD, J.S., NAGARAJA, T.G. - Occurrence of the transferable copper resistance gene *tcxB* among fecal enterococci of U.S. feedlot cattle fed copper-supplemented diets. *Applied and environmental microbiology*, 79, 14 (2013), 4369–4375.

AMINOV, R. - History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact. *Biochemical Pharmacology*, 133 (2017), 4–19.

BAKER-AUSTIN, C., WRIGHT, M.S., STEPANAUSKAS, R., MCARTHUR, J.V. - Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14, 4 (2006), 176–182.

BLANCOU, J. - History of disinfection from early times until the end of the 18th century. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 14, 1 (1995), 21–39.

BRAWANSKI, A. - On the myth of the Edwin Smith papyrus: is it magic or science?. *Acta Neurochirurgica*, 154, 12 (2012), 2285–2291.

CITORIK, R.J., MIMEE, M., LU, T.K. - Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*, 32, 11 (2014), 1141–1145.

CUNHA, B.R., FONSECA, L.P., CALADO, C. - Antibiotic Discovery: Where Have We Come from, Where Do We Go?. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 8, 2 (2019), 21.

DOWLING, A., O' DWYER, J., ADLEY, C.C. - **Antibiotics: Mode of action and mechanisms of resistance**. In: MÉNDEZ-VILAS, A.. *Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs*. Badajoz, Spain: Formatex Research Center, 2017. ISBN: 978-84-947512-0-2, p. 536–545.

DURAND, G.A., RAOULT, D., DUBOURG, G. - Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53, 4 (2019), 371–382.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - **Antimicrobial consumption in the EU/EEA: Annual epidemiological report for 2018**. Stockholm: ECDC, 2019a.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - **Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018**. Stockholm: ECDC, 2019b.

EUROPEAN UNION - **Overview report: Biocides**. Luxembourg: Health and Food Safety Directorate-General, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - **Biocides and Antimicrobial Resistance**. Roma, Itália: FAO, 2018. [Acedido a 26 de março de 2020]. Disponível na Internet: <http://www.fao.org/3/BU655en/bu655en.pdf>

FRAISE, A.P. - **Historical introduction**. In: RUSSELL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J.. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. ISBN: 1-4051-0199-7, p. 3–7.

GNANADHAS, D.P., MARATHE, S.A., CHAKRAVORTTY, D. - Biocides-resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 22, 2 (2013), 191–206.

GOULD, K. - Antibiotics: from prehistory to the present day. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, 3 (2016), 572–575.

JANSEN, G., Aktipis, C.A. - Resistance Is Mobile: The Accelerating Evolution of Mobile Genetic Elements Encoding Resistance. *Journal of Evolutionary Medicine*, 2 (2014), 1–3.

JUTKINA, J., MARATHE, N.P., FLACH, C.F., LARSSON, D. - Antibiotics and common antibacterial biocides stimulate horizontal transfer of resistance at low concentrations. *Science of the Total Environment*, 616-617 (2018), 172–178.

KAPOOR, G., SAIGAL, S., ELONGAVAN, A. - Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33, 3 (2017), 300–305.

KARAKONSTANTIS, S., KRITSOTAKIS, E.I., GIKAS, A. - Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: a systematic review of current epidemiology, prognosis and treatment options. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75, 2 (2020), 271–282.

KARMAKAR, P., GAITONDE, V. - Promising Recent Strategies with Potential Clinical Translational Value to Combat Antibacterial Resistant Surge. *Medicines (Basel, Switzerland)*, 6,1 (2019), 21.

LAMBERT, P.A - **Mechanisms of action of biocides**. In: RUSSELL, A.D., HUGO, W.B., AYLIFFE, G.A.J.. *Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2004. ISBN: 1-4051-0199-7, p. 139–153.

LEMIRE, J.A., HARRISON, J.J., TURNER, R.J. - Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nature reviews. Microbiology*, 11, 6 (2013), 371–384.

LERMINIAUX, N.A., CAMERON, A.D.S. - Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65, 1 (2019), 34–44.

LEWIS, K. - Platforms for antibiotic discovery. *Nature reviews. Drug discovery*, 12, 5 (2013), 371–387.

LING, L.L., SCHNEIDER, T., PEOPLES, A.J., SPOERING, A.L., ENGELS, I., CONLON, B.P., MUELLER, A., SCHÄBERLE, T.F., HUGHES, D.E., EPSTEIN, S., JONES, M., LAZARIDES, L., STEADMAN, V.A., COHEN, D.R., FELIX, C.R., FETTERMAN, K.A., MILLETT, W.P., NITTI, A.G., ZULLO, A.M., CHEN, C., Lewis, K. - A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517, 7535 (2015), 455–459.

MAILLARD, J.Y. - Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*, 92, Suppl (2002), 16S–27S.



MARKARIAN, J. - Steady growth predicted for biocides. *Plastics, Additives and Compounding*, 8, 1 (2006), 30–33.

MULLIS, M.M., RAMBO, I.M., BAKER, B.J., REESE, B.K. - Diversity, Ecology, and Prevalence of Antimicrobials in Nature. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2518 (2019).

MUNITA, J.M., Arias, C.A. - Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4, 2 (2016).

PAL, C., BENGTSSON-PALME, J., KRISTIANSSON, E., LARSSON, D.G. - Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC genomics*, 16, 964 (2015).

PAL, C., ASIANI, K., ARYA, S., RENSING, C., STEKEL, D.J., LARSSON, D., HOBMAN, J.L. - Metal Resistance and Its Association With Antibiotic Resistance. *Advances in Microbial Physiology*, 70 (2017), 261–313.

PARTRIDGE, S.R., KWONG, S.M., FIRTH, N., JENSEN, S.O. - Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology reviews*, 31, 4 (2018).

PAUL, D., CHAKRABORTY, R., MANDAL, S.M. - Biocides and health-care agents are more than just antibiotics: Inducing cross to co-resistance in microbes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 174 (2019), 601–610.

POOLE, K. - Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67, 9 (2012), 2069–2089.

SCENIHR - Effects of biocides on antibiotic resistance. *Green Facts*, (2009), 1–25.

SILVEIRA, E., FREITAS, A.R., ANTUNES, P., BARROS, M., CAMPOS, J., COQUE, T.M., PEIXE, L., NOVAIS, C. Co-transfer of resistance to high concentrations of copper and first-line antibiotics among *Enterococcus* from different origins (humans, animals, the environment and foods) and clonal lineages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 69, 4, (2014), 899–906.

SOUSA, J. C. – **Principais grupos de antibióticos usados na terapêutica**. In: Manual de

Antibióticos Antibacterianos. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, 2006. ISBN 972-8830-49-1, p. 71–637.

UENO, C.M., MULLENS, C.L., LUH, J.H., WOODEN, W.A. - Historical review of Dakin's solution applications. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS*, 71, 9 (2018) 49–55.

**UNIÃO EUROPEIA - REGULAMENTO (UE) N° 528/2012 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de maio de 2012 relativo à disponibilização no mercado e à utilização de produtos biocidas.** Bruxelas, Bélgica: UE, 2012.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION - Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis.** Geneva: WHO, 2017.

## ANEXOS

### ANEXO I – Autorização de utilização da Figura I.

ELSEVIER LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Jul 26, 2020

---

---

This Agreement between Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia -- Maria de Fátima de Brito ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4876610965234
License date	Jul 26, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Plastics, Additives and Compounding
Licensed Content Title	Steady growth predicted for biocides
Licensed Content Author	Jennifer Markarian
Licensed Content Date	January–February 2006
Licensed Content Volume	8
Licensed Content Issue	1
Licensed Content Pages	4
Start Page	30
End Page	33
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No

Will you be translating?	No
Title	Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?
Institution name	Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia
Expected presentation date	Sep 2020
Order reference number	Figure 1. Global consumption of biocides for plastics 2005 - by region.
Portions	Figura 1: Consumo global de Biocidas, por regiões, na indústria de plásticos. (MARKARIAN, 2006) Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia P. C. da Saúde, Azinhaga de Santa Comba
Requestor Location	Coimbra, Coimbra 3000-548 Portugal Attn: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

## **INTRODUCTION**

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## **GENERAL TERMS**

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily

granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no

event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

## **LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

**15. Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

**16. Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

**17. For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository



- via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

**Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

**20. Other Conditions:**

v1.9

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

## ANEXO II – Autorização de utilização da Figura 3.

SPRINGER NATURE LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Jul 26, 2020

---

---

This Agreement between Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia -- Maria de Fátima de Brito ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4876611257640
License date	Jul 26, 2020
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Nature Reviews Drug Discovery
Licensed Content Title	Platforms for antibiotic discovery
Licensed Content Author	Kim Lewis
Licensed Content Date	Apr 30, 2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
High-res required	no
Will you be translating?	no
Circulation/distribution	1 - 29
Author of this Springer Nature content	no
Title	Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?

Institution name	Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia
Expected presentation date	Sep 2020
Order reference number	Figure 1   Targets of antibiotics
Portions	Figura 3: Alvos bacterianos de diferentes classes de antibióticos. (LEWIS, 2013) Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia P. C. da Saúde, Azinhaga de Santa Comba
Requestor Location	Coimbra, Coimbra 3000-548 Portugal Attn: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

## Springer Nature Customer Service Centre GmbH

### Terms and Conditions

This agreement sets out the terms and conditions of the licence (the **Licence**) between you and **Springer Nature Customer Service Centre GmbH** (the **Licensor**). By clicking 'accept' and completing the transaction for the material (**Licensed Material**), you also confirm your acceptance of these terms and conditions.

#### I. Grant of License

1. The Licensor grants you a personal, non-exclusive, non-transferable, world-wide licence to reproduce the Licensed Material for the purpose specified in your order only. Licences are granted for the specific use requested in the order and for no other use, subject to the conditions below.
2. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of the Licensed Material. However, you should ensure that the

material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

3. If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

## 2. Scope of Licence

1. You may only use the Licensed Content in the manner and to the extent permitted by these Ts&Cs and any applicable laws.
2. A separate licence may be required for any additional use of the Licensed Material, e.g. where a licence has been purchased for print only use, separate permission must be obtained for electronic re-use. Similarly, a licence is only valid in the language selected and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence. Any content owned by third parties are expressly excluded from the licence.
3. Similarly, rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee.  
Please apply to [Journalpermissions@springernature.com](mailto:Journalpermissions@springernature.com)/[bookpermissions@springernature.com](mailto:bookpermissions@springernature.com) for these rights.
4. Where permission has been granted **free of charge** for material in print, permission may also be granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
5. An alternative scope of licence may apply to signatories of the STM Permissions Guidelines, as amended from time to time.

## **Duration of Licence**

A licence for is valid from the date of purchase ('Licence Date') at the end of the relevant period in the below table:

Scope of Licence	Duration of Licence
Post on a website	12 months
Presentations	12 months
Books and journals	Lifetime of the edition in the language purchased

## **Acknowledgement**

1. The Licensor's permission must be acknowledged next to the Licenced Material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.

## **Restrictions on use**

1. Use of the Licensed Material may be permitted for incidental promotional use and minor editing privileges e.g. minor adaptations of single figures, changes of format, colour and/or style where the adaptation is credited as set out in Appendix I below. Any other changes including but not limited to, cropping, adapting, omitting material that affect the meaning, intention or moral rights of the author are strictly prohibited.
2. You must not use any Licensed Material as part of any design or trademark.
3. Licensed Material may be used in Open Access Publications (OAP) before publication by Springer Nature, but any Licensed Material must be removed from OAP sites prior to final publication.

## **Ownership of Rights**

1. Licensed Material remains the property of either Licensor or the relevant third party and any rights not explicitly granted herein are expressly reserved.



**Warranty**

IN NO EVENT SHALL LICENSOR BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL OR INDIRECT DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.

**Limitations**

1. **BOOKS ONLY:** Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights of the final author's accepted manuscript (for clarity, NOT the published version) for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline ([www.sherpa.ac.uk/romeo/](http://www.sherpa.ac.uk/romeo/)).

**Termination and Cancellation**

1. Licences will expire after the period shown in Clause 3 (above).
2. Licensee reserves the right to terminate the Licence in the event that payment is not received in full or if there has been a breach of this agreement by you.

**Appendix I - Acknowledgements:**

<b>For</b>	<b>Journal</b>	<b>Content:</b>
Reprinted by permission from [the Licensor]:	[Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)]	[REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)

For **Advance Online Publication** papers:  
Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

**For Adaptations/Translations:**  
Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

**Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:**

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For **Advance Online Publication** papers:  
Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

**For Book content:**  
Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

#### **Other Conditions:**

Version 1.2

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---

## ANEXO III – Autorização de utilização da Figura 4.

ELSEVIER LICENSE

TERMS AND CONDITIONS

Jul 26, 2020

---

---

This Agreement between Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia -- Maria de Fátima de Brito ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4876620100570
License date	Jul 26, 2020
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Elsevier Books
Licensed Content Title	Advances in Microbial Physiology
Licensed Content Author	Chandan Pal,Karishma Asiani,Sankalp Arya,Christopher Rensing,Dov J. Stekel,D.G. Joakim Larsson,Jon L. Hobman
Licensed Content Date	Jan 1, 2017
Licensed Content Pages	53
Start Page	261
End Page	313
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	of 1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier chapter?	No
Will you be translating?	No
Title	Pode a utilização massiva de biocidas contribuir para a seleção de bactérias multirresistentes a antibióticos?

Institution name	Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia		
Expected presentation date	Sep 2020		
Order reference number	Figure 6- Co-selection mechanisms		
Portions	<p>Figura 4: Mecanismos de co-seleção de bactérias resistentes a biocidas e a antibióticos: resistência cruzada, co-resistência e co-regulação. (PAL et al., 2017)</p> <p>Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia P. C. da Saúde, Azinhaga de Santa Comba</p>		
Requestor Location	Coimbra,	Coimbra	3000-548
	Portugal		
	Attn: Universidade de Coimbra, Faculdade de Farmácia		
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12		
Total	0.00 EUR		
Terms and Conditions			

## INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source

must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well

as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

## LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

**15. Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

**16. Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

**17. For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

### **Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:



- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are

not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

**Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation

- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

**20. Other Conditions:**

v1.9

**Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

---