



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Leila Maria Formiga Neto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA: Novo paradigma na tecnologia de vacinas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. João Maia, do Major Francisco Sampaio, do Alferes António Matias e da Professora Doutora Olga Borges Ribeiro, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Leila Maria Formiga Neto

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA: Novo paradigma na tecnologia de vacinas” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. João Maia, do Major Francisco Sampaio, do Alferes António Matias e da Professora Doutora Olga Borges Ribeiro, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021

Eu, Leila Maria Formiga Neto, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016239068, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Vacinas de mRNA: Novo paradigma na tecnologia de vacinas” 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, 14 de setembro de 2021.

Leila Maria Formiga Neto

(Leila Maria Formiga Neto)

## **Agradecimentos**

A chegada à etapa final não se deve a um esforço único, mas também ao apoio e motivação dos que estiveram a meu lado. A eles devo a minha evolução para uma pessoa melhor, mais otimista e que aprendeu a valorizar o que de bom a vida tem. Nestas palavras, refiro-me em primeiro lugar aos meus pais, pelos valores que me transmitiram, por nunca deixarem de acreditar em mim, por apostarem no meu futuro e tornarem possível a realização deste sonho. São para mim um exemplo e uma fonte de inspiração enorme. Em segundo lugar, às minhas irmãs, minhas segundas mães, estão sempre presentes e são um suporte fundamental na minha vida, sem nunca me deixarem duvidar das minhas capacidades. Ao meu Padrinho Paulo por estar sempre disponível para me ajudar e ao meu cunhado Pedro pela motivação. Aos meus pequenitos sobrinhos, onde encontro conforto sempre que os vejo, nos seus pequenos abraços e simples palavras que me enchem o coração e que me fazem querer, cada vez mais, tornar-me um exemplo para eles. Agradecer também à minha prima e amiga Inês, a pessoa que percorreu comigo esta caminhada, lado a lado, juntas conseguimos!

Depois, como não podia deixar de ser, um especial agradecimento à segunda família, à família de Coimbra e que levo para a vida. A três fantásticas pessoas, Filipe, Lucas e Guilherme, pela amizade, presença, paciência e disponibilidade com que ouviram as minhas incertezas, e pelos momentos que passamos durante esta jornada, um muito obrigado por tudo e um até já! À Ângela Mendes pela excelente madrinha e por estar sempre disponível quando preciso e à Rafaela Santos, afilhada do coração, por todas as conversas de motivação mútua. À Bárbara, Joana, Beatriz, Bianca e Bruno pela amizade.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradecer pela formação e conhecimentos que aqui adquiri, e a todos os que para ela contribuíram, em especial à Professora Doutora Olga Borges Ribeiro, pela disponibilidade e atenção com que me orientou.

À equipa da Farmácia Machado, pela forma incrível com que me receberam, pelas excelentes pessoas que são, e por me mostrarem como tudo se torna mais fácil quando trabalhamos em equipa.

Ao Alferes António Matias e ao Major Francisco Sampaio, bem como todos os colaboradores do Laboratório Militar, por terem tornado a minha experiência nas suas instalações muito positiva.

Por último, a esta maravilhosa cidade, Coimbra, uma das escolhas mais acertadas que fiz na vida. É difícil despedir-me dela, irá permanecer a saudade, mas cada vez que aqui voltar, irei com certeza fazer renascer a cumplicidade.

Muito obrigada a todos!

## Índice

### Parte I

#### Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviatura/Siglas .....	8
1. Introdução .....	9
2. Contextualização .....	9
3. Análise SWOT .....	10
3.1. Pontos Fortes.....	10
3.1.1. Integração na equipa .....	10
3.1.2. Interação com a comunidade .....	11
3.1.3. Aquisição de competências .....	11
3.1.4. Diversidade de utentes.....	11
3.1.5. Serviços farmacêuticos .....	12
3.1.6. Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro.....	12
3.1.7. <i>Marketing e merchadising</i> .....	13
3.1.8. Atividades de <i>back office</i> .....	13
3.1.9. Período de realização do estágio .....	14
3.2. Pontos Fracos .....	14
3.2.1. Novo módulo de atendimento do Sifarma .....	14
3.2.2. Medicamentos manipulados.....	15
3.2.3. Aconselhamento de produtos veterinários e de dermocosmética .....	15
3.3. Oportunidades.....	16
3.3.1. Rastreio de intolerância à lactose .....	16
3.3.2. Serviço noturno .....	16
3.3.3. COVID-19 .....	17
3.4. Ameaças .....	17
3.4.1. Medicamentos esgotados.....	17
3.4.2. Imagem do estagiário .....	18
3.4.3. Reconhecimento da profissão de farmacêutico comunitário .....	18
4. Considerações Finais .....	18
5. Casos Práticos.....	19
6. Referências Bibliográficas.....	22

### Parte 2

#### Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas/Siglas .....	24
1. Introdução .....	25
2. Contextualização .....	25
2.1. Serviço de Produção (SP).....	26
2.2. Serviço de Controlo de Qualidade (SCQ).....	26
3. Análise SWOT .....	28
3.1. Pontos Fortes.....	28
3.1.1. Observação/colaboração em muitas das operações do circuito do medicamento no LMPQF.....	28
3.1.2. Manipulação de medicamentos, exclusivamente, produzidos no LMPQF .....	32
3.1.3. Contacto com diversas áreas da indústria farmacêutica.....	33
3.1.4. Integração de equipas multidisciplinares.....	33
3.1.5. Disponibilidade dos profissionais do LMPQF.....	33
3.1.6. Suporte bibliográfico disponibilizado.....	34
3.1.7. Reduzida carga burocrática .....	34

3.1.8.	Formação adequada do MICF para a área de indústria farmacêutica .....	34
3.2.	Pontos Fracos .....	35
3.2.1.	Estágio presencial durante 50 % do tempo.....	35
3.2.2.	Pouca modernização em certas instalações.....	35
3.2.3.	Pouca automatização de certos procedimentos.....	35
3.3.	Oportunidades.....	36
3.3.1.	Conhecimento da profissão de farmacêutico militar.....	36
3.3.2.	Realização de trabalhos nas semanas não presenciais .....	36
3.3.3.	Reestruturação do LMPQF para Laboratório Nacional do Medicamento .....	37
3.4.	Ameaças .....	38
3.4.1.	Difícil acesso à profissão de Farmacêutico Militar .....	38
4.	Considerações Finais .....	38
5.	Referências Bibliográficas.....	40
6.	Anexos .....	41

### **Parte 3** **Monografia**

#### **“Vacinas de mRNA: Novo paradigma na tecnologia de vacinas”**

Resumo .....	44
<i>Abstract</i> .....	45
Lista de Abreviaturas/Siglas .....	46
1. Introdução.....	47
2. Molécula de RNA mensageiro .....	48
3. Vacinas de RNA mensageiro.....	49
3.1. Mecanismo de ação.....	49
3.2. Alvo a atingir .....	50
3.3. Instabilidade da molécula mRNA.....	50
3.4. Formulação .....	51
3.5. Produção.....	53
4. Desenvolvimento das primeiras vacinas de mRNA .....	55
4.1. Pandemia de COVID-19.....	55
4.2. Mecanismo de infecção do vírus SARS-CoV-2.....	56
4.3. Vacinas contra o SARS-CoV-2: BNT162b2, mRNA-1273 e CVnCoV.....	56
4.3.1. Formulações das vacinas .....	58
4.3.2. Eficácia das vacinas .....	61
4.3.3. Condições de conservação das vacinas .....	62
5. Vantagens e desvantagens das vacinas de mRNA.....	62
6. Desafios a ultrapassar .....	63
7. Conclusões e Perspetivas Futuras .....	63
Referências Bibliográficas .....	65

# Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

**Farmácia Machado**



Sob orientação do Dr. João Maia

## **Lista de Abreviatura/Siglas**

CHUC – Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

COVID-19 – Do inglês, *Coronavirus Disease 2019*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FM – Farmácia Machado

IPO – Instituto Português de Oncologia

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT – Do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UC – Universidade de Coimbra

## **1. Introdução**

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) compreende a realização do “Estágio Curricular” no 2º semestre do 5º ano. Esta unidade curricular assume elevada importância na conclusão do percurso académico, uma vez que permite ao estudante contactar com o meio laboral, completar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso e alcançar competências necessárias ao exercício da profissão.

Como disposto no Artigo 44º, n.º 2, da Diretiva 2013/55/EU [1], o estágio tem duração mínima de 6 meses, incluindo 810 horas em farmácia comunitária, às quais podem ser acrescentadas um período de estágio noutra área da profissão farmacêutica. Nesse sentido, o estágio realizou-se em duas dessas áreas, indústria farmacêutica e farmácia comunitária, tendo este último decorrido num mínimo de 670 horas, com a realização prévia de um estágio de verão de 140 horas em farmácia comunitária.

O presente relatório refere-se ao estágio de farmácia comunitária decorrido na Farmácia Machado, em Celas, Coimbra. O relatório de estágio é apresentado sob forma de uma análise SWOT fundamentada, focando nos pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*), a nível interno, bem como oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*), a nível externo.

## **2. Contextualização**

Na Rua Bernardo de Albuquerque 8C, 3000-070 Coimbra, localiza-se a Farmácia Machado (FM), onde decorreu o estágio com início a 12 de abril de 2021 e término a 23 de julho de 2021. O horário do estágio foi alternado semanalmente, com presença quer no horário de abertura, quer no horário de fecho da farmácia. A duração total do estágio foi de 675 horas.

A FM estabeleceu-se em 1917, transitando gerações até chegar à propriedade e direção técnica do Dr. João Maia. Em 2018, foi efetuada a transferência da farmácia para instalações de maiores dimensões, permitindo o alargamento dos serviços realizados na farmácia e a melhoria geral do seu funcionamento.

A equipa da FM é, ainda, constituída por quatro colaboradores, os farmacêuticos Dra. Rita Garrett, Dra. Mariana Lopes e Dr. João Teixeira e o técnico auxiliar Sr. Eduardo Cruz. O horário de funcionamento da FM é compreendido entre as 8h e as 21h, de segunda-feira à sexta-feira e entre as 9h e as 13h ao sábado, para além do horário extraordinário do serviço noturno permanente, rotativo com as restantes farmácias de Coimbra. Nas instalações da FM, encontram-se quatro balcões de atendimento com acesso ao programa informático Sifarma,

um balcão de aconselhamento cosmético, um gabinete destinado a serviços farmacêuticos, um laboratório para a preparação de manipulados, um computador no *back office* com acesso ao Sifarma, uma área de armazenamento dos medicamentos e uma área de armazenamento de documentos.

### 3. Análise SWOT

**Tabela 1:** Resumo da análise SWOT relativa ao estágio na Farmácia Machado.

Pontos Fortes	Pontos Fracos
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Integração na equipa;</li> <li>• Interação com a comunidade;</li> <li>• Aquisição de competências;</li> <li>• Diversidade de utentes;</li> <li>• Serviços farmacêuticos;</li> <li>• Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro;</li> <li>• <i>Marketing</i> e <i>merchadising</i>;</li> <li>• Atividades de <i>back office</i>;</li> <li>• Período de realização do estágio.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Novo módulo de atendimento do Sifarma;</li> <li>• Medicamentos manipulados;</li> <li>• Aconselhamento de produtos veterinários e de dermocosmética.</li> </ul>
Oportunidades	Ameaças
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rastreio de intolerância à lactose;</li> <li>• Serviço noturno;</li> <li>• COVID-19.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medicamentos esgotados;</li> <li>• Imagem do estagiário;</li> <li>• Reconhecimento da profissão de farmacêutico comunitário.</li> </ul>

#### 3.1. Pontos Fortes

##### 3.1.1. Integração na equipa

Um bom ambiente e uma adequada integração na equipa de trabalho são essenciais para maximizar a aprendizagem neste período final do percurso académico. A equipa da FM garantiu essas condições ideais, demonstrando total disponibilidade, motivação e acompanhamento diário durante o estágio. Empenhados na satisfação das necessidades dos utentes, cada colaborador demonstra grande profissionalismo, sendo um bom exemplo do papel que um farmacêutico apresenta na comunidade e como deve desempenhá-lo.

Concretamente, o estágio iniciou-se com a observação da dinâmica da farmácia, da execução de atividades no *back office* e do atendimento aos utentes por parte dos colaboradores. No entanto, rapidamente, foi incentivada a participação na realização das tarefas, com autonomia, fator importante nesta fase de iniciação ao ambiente laboral.

### **3.1.2. Interação com a comunidade**

Para além da boa integração na equipa, também o bom acolhimento no seio da comunidade da FM contribuiu para o balanço positivo do estágio. A comunicação recíproca entre estagiário e utente é um importante estímulo da abertura de espírito e do desenvolvimento da empatia da qual o farmacêutico deve ser dotado.

Durante o atendimento, é importante para a farmácia que se crie uma boa ligação com o utente, para que perdure a vontade de lá regressar. A estratégia da criação de fichas de utente é fundamental, por tornar um futuro atendimento mais célere, por aumentarem a segurança da dispensa de medicamentos, através da consulta de interações com medicação corrente e consulta de dosagens e marcas comerciais anteriormente dispensadas, para além de que possibilita à farmácia o acesso a informações do utente e a consequente satisfação do mesmo por ser reconhecido. Estes fatores são considerados um ponto forte do estágio, por permitirem perceber a importância da fidelização de utentes e como estes pequenos gestos podem fazer a diferença na imagem da farmácia, no seio da comunidade.

### **3.1.3. Aquisição de competências**

O primeiro contacto com farmácia comunitária decorreu durante estágios de verão realizados no final dos 3º e 4º anos de curso, que foram especialmente importantes na compreensão do sistema informático Sifarma, permitindo a aquisição de competências mais acentuadas ao nível da realização, gestão e receção de encomendas.

Na FM, a capacidade de adaptar o discurso consoante o utente e a situação que nos é exposta foi uma das competências mais desenvolvidas, através do contacto direto com os utentes e do atendimento e aconselhamento farmacoterapêutico. Também as diversas atividades de *back office* e a integração na equipa da farmácia proporcionaram o desenvolvimento de outras competências como o espírito crítico, a autonomia, a tomada de iniciativa na resolução de problemas, o desenvolvimento de estratégias de marketing e a valorização do espírito de equipa, fator tão importante para o bom funcionamento da farmácia.

### **3.1.4. Diversidade de utentes**

A localização da FM no interior da cidade de Coimbra, especificamente na proximidade do polo das ciências da saúde da UC e de várias unidades de saúde da cidade (CHUC, IPO, Hospital Pediátrico, Centro de Saúde de Celas, entre outros), proporciona a diversidade de utentes que se dirigem à farmácia. Na generalidade, a comunidade servida pela farmácia inclui: utentes fidelizados, que habitam na proximidade da farmácia; utentes habituais que, apesar de

possuírem residência noutros pontos do país, têm consultas regulares nas unidades de saúde de Coimbra; utentes pontuais, como sejam jovens estudantes da UC, turistas, ou pessoas que vêm diretamente de uma urgência hospitalar. Independentemente do perfil, todos os utentes são merecedores de especial atenção por parte da equipa da FM, que aposta num atendimento personalizado.

Esta localização da farmácia foi uma das características enriquecedoras do estágio por permitir contactar com diferentes situações diariamente, como diferentes patologias e sintomas, estimulando a capacidade de moldar a comunicação e postura para a melhor satisfação da necessidade do utente. Da mesma forma, o contacto com os utentes durante o estágio possibilita a perceção do estado de espírito com que chegam à farmácia, muitas vezes, demonstrando desânimo e insegurança. Consequentemente, o discurso do farmacêutico no atendimento deve, não só transmitir as informações necessárias à correta cedência da medicação, mas também transmitir a segurança que o utente necessita e deseja para uma boa adesão à terapêutica. Neste contexto, o farmacêutico é estimulado a adquirir continuamente o conhecimento necessário para maximizar a confiança que demonstra no atendimento.

### **3.1.5. Serviços farmacêuticos**

A FM tem uma variedade de serviços farmacêuticos disponíveis aos seus utentes, nomeadamente, medição de parâmetros bioquímicos (glicémia, colesterol e pressão arterial), consultas de nutrição, consultas de dermocosmética, rastreios auditivos, administração de vacinas e, mais recentemente, testagem rápida de antigénio à infeção por SARS-CoV-2.

Estes são fatores que, para além de acrescentarem valor à farmácia, constituem um ponto forte do estágio, pela possibilidade de realizar alguns dos serviços, como a medição de parâmetros bioquímicos, onde, simultaneamente, foi desenvolvida a proximidade com os utentes.

### **3.1.6. Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro**

A Farmácia Machado constitui uma das farmácias que, pela proximidade ao IPO de Coimbra, tem um protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro. Esta entidade ajuda financeiramente na aquisição de medicação por parte de alguns dos seus utentes que, de outra forma, não teriam essa possibilidade. Essa medicação vem mencionada na ficha de referência elaborada pela assistente social da Liga e que acompanha a(s) receita(s) médica(s), necessariamente levantadas numa destas farmácias, para que possam usufruir deste apoio. Assim sendo, a FM recebe, todos os dias, doentes oncológicos, frequentemente

deprimidos física e psicologicamente. O contacto com estes utentes permite tomar consciência de que o papel do farmacêutico comunitário não se resume, apenas, a garantir a correta administração da medicação mais indicada ao seu estado de saúde, mas também a transmitir as palavras assertivas mais indicadas ao seu estado de alma, motivadoras da continuação do longo percurso terapêutico que se espera eficaz.

### **3.1.7. Marketing e merchadising**

A FM apresenta uma variedade de produtos não sujeitos a receita médica expostos aos utentes na sala de atendimento, cuja visibilidade e rotatividade está dependente da aplicação de estratégias de *marketing* e *merchadising* adequadas. A observação e cooperação no desenvolvimento destas estratégias fez parte da rotina semanal do estágio e englobaram a disposição adequada dos produtos nas gôndolas e lineares, a atribuição de promoções a produtos com menor rotatividade, a identificação de pontos quentes, a afixação de cartazes na montra e balcões e a criação de vídeos para publicação nas redes sociais da farmácia.

As estratégias de *marketing* são aplicadas não só aos medicamentos não sujeitos a receita médica e produtos de dermocosmética, mas também para transmitir informações importantes sobre o funcionamento da farmácia e publicitar certos serviços farmacêuticos. A nível das estratégias de *merchadising*, a FM oferece aos seus utentes, quando oportuno, amostras de produtos de dermocosmética, adequadas ao tipo de pele e necessidade do utente.

A realização deste tipo de atividades para produtos de dermocosmética estimulou o conhecimento da composição e indicação farmacoterapêutica dos mesmos, contribuindo para minimizar um dos pontos fracos considerado mais adiante nesta análise SWOT, nomeadamente, a falta de confiança no aconselhamento dos produtos de dermocosmética.

### **3.1.8. Atividades de back office**

Entende-se por atividades de *back office* as funções realizadas na retaguarda do local de trabalho, ou seja, que não envolvem o contacto com o utente. No *back office* da FM, foi possível observar/colaborar na realização de tarefas, nomeadamente:

- arrumação adequada dos medicamentos e outros produtos farmacêuticos;
- envio e receção de encomendas;
- devolução de produtos;
- execução dos processos burocráticos que envolvem o fecho mensal:
  - verificação do receituário e envio à respetiva entidade de participação;
  - revisão e organização de receitas manuais;

- revisão do registo de psicotrópicos;
  - verificação dos prazos de validade dos produtos da farmácia;
  - balanço da faturação mensal.
- envio do ValorMed;
  - gestão de *stocks*;
  - comunicação com fornecedores;
  - comunicação com delegados de marcas farmacêuticas.

O contacto com estas atividades permitiu desenvolver aptidões técnicas, intrínsecas à farmácia comunitária. Uma das tarefas realizadas diariamente, a arrumação de medicamentos e a sua repetida disposição, organizados consoante sejam de uso humano ou veterinário, a via de administração e a forma farmacêutica, facilitou a memorização de nomes comerciais e princípios ativos que os compõem, aspeto com o qual não temos contacto na faculdade.

### **3.1.9. Período de realização do estágio**

No período maioritário em que o estágio decorreu, a FM não recebeu nenhum outro estagiário, o que maximizou o desenvolvimento de competências, não só pela maior disponibilidade dos profissionais para a transmissão de conhecimentos, mas também pela maior necessidade de colaboração nas tarefas diárias da farmácia.

Por outro lado, o facto da duração do estágio cobrir uma parte dos meses de verão, junho e julho, época de usufruto de férias por parte dos colaboradores da farmácia, fomentou ainda mais a rápida aquisição de autonomia, de modo a cooperar no bom funcionamento da farmácia que tem de ser garantido, independentemente da altura do ano.

## **3.2. Pontos Fracos**

### **3.2.1. Novo módulo de atendimento do Sifarma**

O Sifarma é um *software* de gestão e atendimento das farmácias comunitárias, desenvolvido pela Glintt. Com uma utilização por 90 % das farmácias em Portugal, o Sifarma é uma ferramenta que auxilia o farmacêutico no bom aconselhamento do utente [2]. O primeiro a ser desenvolvido, o Sifarma 2000<sup>®</sup>, é o sistema informático mais utilizado, atualmente, nos atendimentos da FM. O novo módulo de atendimento do Sifarma, é um programa ainda em desenvolvimento, dotado de novos campos que facilitam o processo informático de atendimento. Apesar de todos os balcões da FM terem acesso ao novo módulo de atendimento do Sifarma, o programa informático maioritariamente utilizado é o Sifarma

2000<sup>®</sup>, pela preferência por este sistema. Mesmo sendo considerado um ponto fraco do estágio por ser pouco utilizado, a FM permitiu o contacto com o novo Sifarma e transmitiu a razão por este ainda ser pouco utilizado, nomeadamente, por estar ainda em processo de desenvolvimento com atualizações regulares que podem interromper a sequência de atendimentos e, por momentos, indisponibilizar um computador, o que não favorece o bom funcionamento da farmácia.

### **3.2.2. Medicamentos manipulados**

Medicamento manipulado é definido no Decreto-Lei n.º 95/2004, de 22 de abril, como qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado numa farmácia comunitária ou serviços farmacêuticos hospitalares, sob a responsabilidade de um farmacêutico. As fórmulas magistrais são preparadas segundo uma receita médica que especifica o doente a quem se destina, enquanto os preparados oficiais são preparados segundo indicações compendiais de uma Farmacopeia ou Formulário [3]. Durante o estágio, foi possível observar a preparação de xaropes, com a reconstituição do pó, forma farmacêutica no qual são comercializados. No entanto, a preparação de manipulados não se verificou durante este período, uma vez que os mesmos não foram solicitados na farmácia.

### **3.2.3. Aconselhamento de produtos veterinários e de dermocosmética**

Veterinária e dermocosmética foram as áreas para a qual a falta de confiança nos atendimentos foi mais notória, aliada ao sentimento de falta de preparação e conhecimento sobre as mesmas. Apesar de terem sido abordados nas disciplinas de “Preparações de Uso Veterinário” e “Dermofarmácia e Cosmética”, a grande variedade de produtos, principalmente, de dermocosmética, presentes na FM, contribuiu para que o aconselhamento dos mesmos fosse uma das maiores dificuldades sentidas no estágio. Consequentemente, os pedidos frequentes de aconselhamento sobre os produtos, a sua eficácia, o modo de administração e a posologia requereram a presença e auxílio de um colaborador.

Por outro lado, o estágio curricular faz parte da contínua aprendizagem do curso, não sendo expectável que todos os conhecimentos necessários ao mundo laboral sejam já adquiridos e, nesse aspeto, todos os aconselhamentos realizados incrementaram os conhecimentos sobre estas áreas, para além de que as dificuldades sentidas foram incentivadoras da contínua aquisição de competências, através de formações, pesquisas e aprendizagem autónoma, quer durante o estágio, quer na futura vida profissional.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Rastreio de intolerância à lactose**

Durante o estágio na FM, foi realizado um rastreio de intolerância à lactose, disponível gratuitamente para os utentes. No decorrer do mesmo, a oportunidade de compreender as etapas do rastreio foi importante para a melhor compreensão do mecanismo, sinais e sintomas deste tipo de intolerância alimentar, que é tão comum e, simultaneamente, desconhecida para muitos utentes que a têm. A intolerância à lactose caracteriza-se pelo aparecimento de sintomas abdominais (dor abdominal, distensão abdominal e diarreia) após ingestão de lactose por um indivíduo com má absorção deste dissacarídeo. A má absorção é provocada por uma deficiente expressão da lactase, enzima responsável pela hidrólise da lactose nos monossacarídeos, galactose e glicose, que são posteriormente absorvidos [4].

O rastreio decorreu através das seguintes etapas: medição inicial da glicémia do utente, ingestão de uma solução padronizada contendo lactose e medição final da glicémia, aproximadamente, 30 minutos depois. O nível final de glucose no sangue, reflete a degradação da lactose, pela ação lactase no intestino, com a consequente absorção da glucose resultante. Quanto menor é a diferença entre os valores inicial e final da glicémia, menor foi a absorção de glucose e, conseqüentemente, maior é o grau de intolerância à lactose.

#### **3.3.2. Serviço noturno**

As farmácias da cidade de Coimbra cumprem uma escala de serviço permanente, de modo que permaneçam sempre duas farmácias abertas por noite, destinado à satisfação das necessidades urgentes do público. Este serviço implica a permanência da farmácia aberta ininterruptamente, desde a hora de abertura normal de um determinado dia, até às 22 horas desse dia, após as quais deve permanecer um farmacêutico, ou auxiliar habilitado, nas instalações, até à hora de abertura do dia seguinte. Durante o serviço noturno, o atendimento é realizado ao postigo, quando solicitado, mediante chamada, ao qual pode acrescer uma taxa de chamada para dispensa de medicamentos sem receita médica [5].

A FM possibilita aos seus estagiários, segundo a sua vontade, a oportunidade de acompanhar noites de serviço, o que permitiu o contacto com situações de maior urgência, particularmente, solicitação de antibióticos, acompanhados de receita médica, e solicitação de contracção de emergência, cuja toma deve ocorrer o mais rápido possível.

### **3.3.3. COVID-19**

A COVID-19, doença provocada pelo SARS-CoV-2, surgiu no final do ano de 2019 e continua prevalente em quase todo o mundo, enquanto os países estão empenhados na imunização das suas populações. A pandemia causada pelo vírus, obrigou à tomada de medidas no nosso país, durante os anos de 2020 e 2021, com o objetivo de travar a transmissibilidade, morbidade e mortalidade da doença. Felizmente, as medidas de confinamento implementadas não afetaram o estágio, que decorreu normalmente no período esperado. Em vez de um ponto negativo, este período pandémico proporcionou oportunidades relacionadas com a maior afluência de utentes à farmácia. As unidades de saúde passaram a ter um acesso limitado, o que levou muitos utentes com situações menores a dirigirem-se à farmácia, ao invés das urgências hospitalares, depositando maior confiança no farmacêutico. Por outro lado, a COVID-19, para além de ter fomentado a autonomia, permitiu pôr em prática alguns conhecimentos adquiridos ao longo das pesquisas realizadas para a monografia. O facto de serem abordadas as vacinas de mRNA contra a COVID-19 na monografia, proporcionou a obtenção de um conhecimento mais profundo do mecanismo destas vacinas e, por conseguinte, facilitou o aconselhamento ao nível do esclarecimento de dúvidas, da supressão do ceticismo e consciencialização dos utentes para a vacinação.

Sob outra perspetiva, a capacidade de adaptação às novas circunstâncias que a pandemia impôs acabou por ser uma excelente preparação para a realidade do mundo profissional, onde a resolução de problemas e a procura de soluções será uma constante.

## **3.4. Ameaças**

### **3.4.1. Medicamentos esgotados**

A existência de medicamentos esgotados verificou-se, com alguma frequência, durante o estágio e, apesar de ser um fator externo à farmácia, acaba por influenciar negativamente a imagem da mesma e constituir uma ameaça para o estágio, nomeadamente, pela demonstração de descontentamento de alguns utentes que não têm perceção que a origem do problema é independente da vontade da farmácia em adquirir o medicamento.

Alguns dos medicamentos esgotados, frequentemente solicitados, e que, por isso, maior transtorno causaram, quer ao nível do atendimento, quer na gestão das notas de encomenda, foram a Victoza<sup>®</sup> (solução injetável de liraglutido, 6 mg/mL) e o Xeplion<sup>®</sup> (solução injetável de libertação prolongada de paliperidona, 100 mg).

### **3.4.2. Imagem do estagiário**

A imagem que o público atribui ao estagiário não favorece o desenvolvimento de autonomia ao nível do atendimento, tornando-se uma ameaça à aquisição desta competência. Recusar ser atendido por um estagiário ou pôr em causa as ações realizadas e as informações transmitidas por este, verificou-se, ocasionalmente, ao longo do estágio, proporcionado pela falta de confiança do utente nas capacidades e conhecimentos do estagiário.

Por vezes, o ambiente tenso instalado por uma abordagem menos simpática e pela falta de compreensão de certos utentes, no que requer à inexperiência do estagiário, não permitiu alcançar um atendimento bem-sucedido. Não obstante, a generalidade da integração na comunidade da FM foi bastante positiva, marcada por utentes compreensíveis e com uma boa disposição característica, que tornam o ato farmacêutico de atendimento e aconselhamento muito gratificante.

### **3.4.3. Reconhecimento da profissão de farmacêutico comunitário**

Este tópico, que finaliza a análise SWOT, é aqui considerado como uma ameaça não só ao estágio, mas também à profissão de farmacêutico comunitário. Ao longo do estágio, através do acompanhamento diário do esforço que a profissão exige, foi possível concluir que esta não tem o merecido reconhecimento. Esta análise não foi inferida pelo contacto com outros profissionais de saúde que, ao contrário do expectável, não transmitiram qualquer depreciação por esta profissão. Foi junto do público da FM que este ponto de vista foi desenvolvido, em virtude de certos utentes que não vêem o farmacêutico como um profissional de saúde, apenas como um simples dispensador de medicamentos. Comportamentos como reclamar a lentidão do atendimento, tornam o exercício desta profissão extremamente frustrante, especialmente quando o farmacêutico está a dar o seu melhor, para satisfazer as necessidades do utente, ao proceder ao ato farmacêutico que, no nosso país, não é remunerado. É urgente mudar esta mentalidade, para que os estudantes em final de curso, a realizar o estágio numa farmácia comunitária, não percam o entusiasmo por esta nobre profissão.

## **4. Considerações Finais**

Após a análise das fraquezas, forças, oportunidades e ameaças, a conclusão traduz-se num balanço muito positivo do estágio. As quinze semanas de convivência com os colaboradores da FM superaram as expectativas, a nível pessoal e profissional, desde uma boa receção no primeiro dia, da transmissão de conhecimentos e conselhos sobre a profissão, e

da saída emotiva, no último dia, com uma bagagem de competências e pensamento positivo em relação ao futuro que se avizinha. Com o término do estágio, o sentimento que prevalece é de imensa gratidão pelas capacidades desenvolvidas, conhecimentos adquiridos, autonomia conquistada e espírito de equipa transmitido pelos profissionais da FM. Ainda assim, prevalece a consciência de que o conhecimento absoluto na área de farmácia comunitária é uma utopia que ainda está muito longe de ser alcançada, no qual os anos de experiência laboral serão importantes, mas a aprendizagem será contínua por toda a vida profissional.

O comprometimento com a profissão, sentido de responsabilidade, dedicação em manter a atualização do conhecimento e prestação dos melhores cuidados farmacêuticos aos utentes, para um bom exercício da profissão, é algo que levo da FM para o meu futuro profissional.

## **5. Casos Práticos**

### **Caso Prático I**

Uma mulher, entre os 35 e 45 anos, dirige-se à FM com queixas de comichão na zona genital. A primeira questão efetuada foi se sentia ardor ao urinar, ao qual responde que não e acrescenta que os sintomas incluem, apenas, desconforto e, por vezes, prurido. O aconselhamento é iniciado com medidas não farmacológicas, evidenciando a importância da lavagem diária da zona genital com um gel de lavagem íntima que tenha um pH adequado ao pH ácido vaginal, nomeadamente, marcas comerciais como Lactacyd<sup>®</sup>, Saforelle<sup>®</sup> ou Saugella<sup>®</sup>. A utente interpela dizendo que já o faz regularmente e que os sintomas se mantêm. Dessa forma, existe a necessidade de adicionar uma medida farmacológica aos hábitos de higiene já estabelecidos, com o objetivo de controlar a candidíase, infeção fúngica com maior probabilidade de ser a responsável pelos sintomas da utente. Assim, é recomendado à utente o creme vaginal Candiset<sup>®</sup> 10 mg/g, que tem como substância ativa o cotrimazol, um antifúngico que inibe a síntese do ergosterol e induz danos estruturais e funcionais na membrana citoplasmática do fungo. O Candiset<sup>®</sup> deve ser aplicado durante 7 dias, ao deitar e em profundidade na vagina, com a ajuda do aplicador [6]. Por fim, é reforçada a importância de manter uma higiene diária, evitando usar o normal gel de banho na zona íntima, uma vez que torna o pH vaginal mais básico, o que provoca a proliferação da *Candida albicans* que, apesar de fazer parte da microbiota vaginal, causa frequentemente candidíase quando ocorre uma disbiose na zona genital.

Já no final do atendimento, a utente coloca uma dúvida em relação ao perfil posológico que mais se adequa à sua situação, nomeadamente, se pode iniciar o tratamento de imediato,

uma vez que dentro de 1 a 2 dias iniciará a menstruação. Nesse caso, a informação transmitida à utente é que deve aguardar até ao final da menstruação para iniciar o tratamento e efetuarlo durante 7 dias consecutivos.

## **Caso Prático 2**

Um homem, entre os 20 a 30 anos, dirige-se à FM com intenção de pedir um aconselhamento para aquilo que pensa ser um fungo no pé, mostrando uma fotografia que tirou do espaço intersticial entre o dedo mínimo e o dedo seguinte. Após observar a imagem, onde a pele se encontra totalmente branca, o homem é questionado se os sintomas incluem comichão e mau odor, ao qual responde positivamente. Os sintomas e sinais indicam, realmente, tratar-se de um fungo, cujo tratamento necessita de medidas farmacológicas de aplicação tópica. Procede-se ao aconselhamento dos seguintes medicamentos:

- Canesten Unidia® solução para pulverização cutânea – solução contendo bifonazol (10 mg/g), indicado nas micoses interdigitais provocadas por fungos suscetíveis (*Tinea pedis*, *Tinea manuum*) e na pitiríase versicolor. O bifonazol inibe a biossíntese do ergosterol em dois níveis diferentes, induzindo danos estruturais e funcionais na membrana citoplasmática do fungo [7].
- Canesten® pó cutâneo – pó contendo clotrimazol (10 mg/g), indicado como adjuvante do tratamento com Canesten® Solução para pulverização ou Canesten® Creme, desempenhando uma ação antimicótica e na profilaxia de recidivas [8].

O Canesten Unidia® deve ser aplicado uma vez por dia, preferivelmente, à noite, durante 3 a 4 semanas, aplicando uma quantidade fina na área afetada e friccionando ligeiramente. O Canesten® pó cutâneo deve ser utilizado como adjuvante no tratamento, devendo ser aplicado no calçado, no dia antes de os utilizar, e nas meias. Para além da aplicação destes medicamentos, o doente deve adotar medidas não farmacológicas como a lavagem regular dos pés e a secagem total do espaço intersticial dos dedos. O ideal para a proliferação dos fungos são ambientes quentes e húmidos que devem, por isso, ser contrariados com estes cuidados.

Quando questionado, o utente refere que estes sintomas estão instalados apenas no pé direito. No entanto, é recomendado a aplicação do Canesten® Pó em ambas as meias e calçado, também deve proceder à secagem, primeiramente, do pé sem infeção (esquerdo) e só depois do pé com infeção (direito), após lavagem, para evitar a transmissão de um pé para o outro, que é muito fácil de ocorrer. Para além disso, deve colocar a toalha utilizada para

lavar, desinfetar a estrutura onde lavou os pés e não partilhar calçado, para evitar a transmissão para outras pessoas.

Para terminar o aconselhamento, é transmitido ao utente que, após as 3 ou 4 semanas de tratamento, o utente pode e deve continuar a polvilhar as meias e o calçado com o Canesten® Pó, visando absorver a humidade e evitar reinfeções.

### **Caso Prático 3**

Uma mulher dirige-se à FM, com idade entre os 20 e 30 anos, com queixas de diarreia. Descreve que o conteúdo defecado não é totalmente líquido, mas que se verifica mais amolecido há cerca de 3 dias. Com estes sintomas, a primeira pergunta a questionar é se tem febre associada, à qual a utente responde que não. Como a descrição da utente não corresponde a uma diarreia grave e não se demonstra muito incomodada com a situação, evitamos aconselhar o conhecido Imodium®, uma vez que está indicado para diarreias agudas e crónicas e a substância ativa, loperamida, provoca, frequentemente, o efeito secundário de obstipação, o que não contribui para o equilíbrio intestinal [9]. O aconselhamento mais seguro para repor o normal funcionamento intestinal consiste na toma de probióticos. Os probióticos são microrganismos vivos, frequentemente, bactérias (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) e leveduras (*Saccharomyces*) que, nas doses adequadas, ajudam a repor a microbiota intestinal. A interação entre os microrganismos intestinais e o hospedeiro, não só contribui para o normal funcionamento do intestino, como também tem grande influência no estado geral de saúde [10]. Procede-se ao aconselhamento do Biofast®, um suplemento alimentar cuja composição contém probióticos (10 estirpes de *Bifidolactus*), prebióticos (fruto-oligossacáridos) e vitaminas do complexo B, atuando em várias vertentes para o bem-estar da mucosa intestinal. Cada embalagem tem 8 saquetas de pó, que deve ser dissolvido em água e tomado uma vez por dia [11]. Mesmo que os sintomas terminem antes, a utente pode e deve tomar a caixa até ao fim. Para além disso, a utente deve adotar medidas não farmacológicas, nomeadamente, beber muita água, evitar alimentos fritos e condimentados e optar por alimentos cozidos e grelhados.

## 6. Referências Bibliográficas

- [1] PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, “Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013,” *J. Of. da União Eur.*, vol. 354, pp. 132–170, 2013.
- [2] GLINTT - Sifarma. [Acedido a 25 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
- [3] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Diário da República, I Série-A 2439, Decreto-Lei n.º 95/2004 de 22 de Abril. pp. 2439–2441, 2004.
- [4] MISSELWITZ B., BUTTER M., VERBEKE K., FOX M. - Recent advances in clinical practice Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management Box I Pathophysiology of lactose malabsorption. *Gut*, vol. 68, pp. 2080–2091, 2019, doi: 10.1136/gutjnl-2019-318404.
- [5] INFARMED I.P. - Portaria n.º 256/81 de 10 de Março, Serviço de Turnos (Revogado tacitamente pelo Decreto-Lei n.º 53/2007, de 8 de Março). pp. 10–14, 2007.
- [6] INFARMED I.P. - Resumo das Características do Medicamento - Candiset. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- [7] INFARMED I.P. - Resumo das Características do Medicamento - Canesten Unidia Solução para pulverização. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- [8] INFARMED I.P. - Resumo das Características do Medicamento - Canesten Pó cutâneo. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- [9] INFARMED I.P. - Resumo das Características do Medicamento - Imodium. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
- [10] ZAWISTOWSKA-ROJEK A., TYSKI S. - Are probiotic really safe for humans? - *Polish J. Microbiol.*, vol. 67, no. 3, pp. 251–258, 2018, doi: 10.21307/pjm-2018-044.
- [11] SILFARMA - Biofast. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://silfarmaplus.pt/produto/biofast/>

## **Parte 2**

**Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica**  
**Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos,**  
**LMPQF**



Sob orientação do Major Farmacêutico Francisco Sampaio e do  
Alferes Farmacêutico António Matias

## **Lista de Abreviaturas/Siglas**

ARS – Administração Regional de Saúde

COVID-19 – Do inglês, *Coronavirus Disease 2019*

EA – Escola das Armas

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FFUL – Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

GMP – Do inglês, *Good Manufacturing Practice*

GPTs – Do inglês, *Growth Promotion Tests*

HPLC – Do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*

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

ISO – Do inglês, *Internacional Organization of Standardization*

LM – Laboratório Nacional do Medicamento

LMPQF – Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MP(s) – Matéria(s)-prima(s)

PA(s) – Produto(s) acabado(s)

PAM – Prova de Aptidão Militar

PHE – Do inglês, *Public Health England*

QPs – Quadros Permanentes

RSD – Do inglês, *Relative Standard Deviation*

SABA – Solução Antissética de Base de Alcoólica

SAC – Serviço de Análises Clínicas

SCQ – Serviço de Controlo de Qualidade

SICAD – Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências

SL – Serviços de Logística

SNS – Serviço Nacional de Saúde

SP – Serviço de Produção

SSM – Sistema de Saúde Militar

SWOT – Do inglês, *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

UAGME – Unidade de Apoio Geral de Material do Exército

UFCs – Unidades Formadoras de Colónia

## **1. Introdução**

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) compreende a realização do estágio curricular no 2º semestre do 5º ano. Esta unidade curricular assume elevada importância na conclusão do percurso académico, uma vez que permite ao estudante contactar com o meio laboral, completar os conhecimentos adquiridos ao longo do curso e alcançar as competências necessárias ao exercício da profissão.

Como disposto no Artigo 44º, n.º 2, da Diretiva 2013/55/EU [1], o estágio tem duração mínima de 6 meses, incluindo 810 horas em farmácia comunitária, à qual podem ser acrescentadas um período de estágio noutra área da profissão farmacêutica. Nesse sentido, o estágio foi dividido em duas dessas áreas, indústria farmacêutica e farmácia comunitária.

O presente relatório refere-se ao estágio em indústria farmacêutica, realizado no Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos (LMPQF), em Lisboa. O relatório de estágio é apresentado sob forma de uma análise SWOT fundamentada, focando nos pontos fortes (*Strengths*) e pontos fracos (*Weaknesses*), a nível interno, bem como oportunidades (*Opportunities*) e ameaças (*Threats*), a nível externo.

## **2. Contextualização**

Na avenida Dr. Alfredo Bensaúde, Olivais Norte, 1849-012 Lisboa, localiza-se a sede do LMPQF, onde decorreu o estágio com início a 11 de janeiro de 2021 e término a 9 de abril de 2021. Este período de três meses decorreu em pleno pico da pandemia de COVID-19 e num estado confinamento nacional, durante o qual o Laboratório Militar formou duas equipas entre colaboradores e estagiários, que funcionaram em espelho, estando presencialmente no laboratório em semanas alternadas, no horário das 9h às 17h, de segunda a sexta.

O LMPQF foi fundado a 10 de fevereiro de 1918, durante a 1ª Guerra Mundial, pelas Forças Armadas portuguesas, com objetivo de apoiar a logística farmacêutica no envolvimento da guerra [2]. Atualmente, de modo abrangente, o foco do LMPQF é combater as falhas no mercado farmacêutico causadas, maioritariamente, por desinteresse financeiro das restantes indústrias farmacêuticas, ou por rutura no fornecimento de certos produtos. Exemplos disso são os medicamentos destinados a doenças raras, cuja pouca procura não compensa o custo da sua produção, e produtos cuja elevada procura causa a rutura de stock, como por exemplo o desinfetante neste período de pandemia. Por ser uma indústria pública, tutelada pelo Estado Português, responde às necessidades do SNS, mantendo uma reserva estratégica de certas matérias-primas e produtos acabados nas suas instalações. Por um lado, tanto produz medicação personalizada, como a solução estéril de histidinato de cobre para, apenas, três

doentes com doença neurológica de Menkes em Portugal, como também, por outro lado, produz cerca de três milhões de saquetas de solução de cloridrato de metadona anuais, integrado no programa do Serviço de Intervenção nos Comportamentos Aditivos e nas Dependências (SICAD). É o único responsável pela produção e distribuição de metadona em Portugal, por oferecer condições de segurança nas instalações onde é armazenado este estupefaciente. Para além disso, produz medicamentos para fazer face a situações de emergência, de epidemia ou pandemia, assegura a logística sanitária militar necessária ao Sistema de Saúde Militar (SSM) e às Forças Armadas, aos seus familiares e aos deficientes militares e presta apoio sanitário às Forças Armadas, nomeadamente, em análises clínicas, análises de águas de consumo humano, controlo de ambientes, desinfestações, desratizações e desinfeções. Por todos estes motivos, o LMPQF é uma indústria singular a nível nacional, que desempenha um papel de importância estratégica [3].

A distribuição dos produtos farmacêuticos produzidos no LMPQF é, maioritariamente, realizada para instalações militares, como as farmácias comunitárias presentes nas diferentes sucursais, e para as ARS que, por sua vez, distribuem para as diversas unidades de saúde do país.

Para dar resposta a todas as competências atribuídas, o LMPQF apresenta serviços diferenciados, mas que funcionam em concomitância, através de uma comunicação constante entre si, de forma a manter a fluidez do circuito do medicamento e dos serviços prestados. Nos cinco pisos do edifício principal do LMPQF, encontram-se os serviços de produção, controlo de qualidade, análises clínicas, logística e a farmácia comunitária. A concretização do estágio ocorreu nos serviços de produção e de controlo de qualidade.

### **2.1. Serviço de Produção (SP)**

O serviço de produção é responsável pela produção dos medicamentos, baseando todas as atividades, procedimentos e instalações nas Boas Práticas de Fabrico (GMP) descritas no EudraLex. Os medicamentos produzidos, não necessitam de pedido de AIM, nem requerem aprovação pelo INFARMED, por se tratarem, na sua maioria, de medicamentos manipulados, nomeadamente, preparados oficinais que seguem as indicações compendiais da farmacopeia [4].

### **2.2. Serviço de Controlo de Qualidade (SCQ)**

O serviço de controlo de qualidade garante a conformidade dos produtos, quer sejam matérias-primas, produtos acabados ou outro tipo de amostras, como águas internas (matéria-

prima e de lavagem) e externas (águas de consumo humano), de acordo com a farmacopeia europeia, as normas descritas pelas ISO e a lei portuguesa. Este serviço é subdividido em dois laboratórios, o de ensaios físico-químicos (que também engloba o de métodos instrumentais de análise) e o de ensaios microbiológicos, que se complementam nas atividades realizadas para verificação de qualidade das amostras. As amostras mais frequentemente analisadas pelo controlo de qualidade são provenientes de produtos acabados produzidos com maior regularidade no LMPQF, como a solução oral de cloridrato de metadona ou o xarope de isoniazida. No entanto, muitos dos medicamentos são produzidos e libertados sem passar pelo laboratório de controlo de qualidade, por constituírem produções em pequena escala de medicamentos manipulados. Nesses casos, a verificação da qualidade e conformidade do produto é realizado no produto acabado, ainda no serviço de produção, através de análises simples como verificação do aspeto, homogeneidade, peso, entre outras características.

A função do controlo físico-químico é garantir a conformidade dos produtos, sejam eles matérias-primas, produtos acabados ou materiais de embalagem. Os ensaios são realizados de acordo com a farmacopeia ou com métodos internos validados previamente.

O controlo microbiológico, para além do controlo dos medicamentos produzidos no Laboratório, também realiza análises a águas de piscina e águas de consumo humano (rotina I, 2 e inspeção), provenientes de instalações do exército, como a Escola das Armas (EA), Lar Militar da Cruz Vermelha, Unidade de Apoio Geral de Material do Exército (UAGME), entre outros, e água purificada (matéria-prima) oriunda do circuito de purificação de água instalado no LMPQF.

### 3. Análise SWOT

**Tabela I:** Resumo da análise SWOT relativa ao estágio no LMPQF.

<b>Pontos Fortes</b>	<b>Pontos Fracos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Observação/colaboração em muitas das operações do circuito do medicamento no LMPQF;</li><li>• Manipulação de medicamentos, exclusivamente, produzidos no LMPQF;</li><li>• Contacto com diversas áreas da indústria farmacêutica;</li><li>• Integração em equipas multidisciplinares;</li><li>• Disponibilidade dos profissionais do SP e SCQ;</li><li>• Suporte bibliográfico disponibilizado;</li><li>• Reduzida carga burocrática;</li><li>• Formação adequada do MICF para a área de indústria farmacêutica.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Estágio presencial durante 50 % do tempo;</li><li>• Pouca modernização em certas instalações;</li><li>• Pouca automatização de certos procedimentos.</li></ul>
<b>Oportunidades</b>	<b>Ameaças</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Conhecimento da profissão de farmacêutico militar e acessibilidade desta;</li><li>• Realização de trabalhos nas semanas não presenciais;</li><li>• Reestruturação do LMPQF para Laboratório Nacional do Medicamento.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Dificil acesso à profissão de Farmacêutico Militar.</li></ul>

#### 3.1. Pontos Fortes

##### 3.1.1. Observação/colaboração em muitas das operações do circuito do medicamento no LMPQF

Como referido, o estágio foi dividido em duas partes, passando pelos serviços de produção (SP) e de controlo de qualidade (SCQ). No entanto, situando-se mais serviços no mesmo edifício (serviços de logística (SL) e análises clínicas (SAC)), foi possível perceber o funcionamento superficial dos mesmos, integrando o circuito do medicamento no Laboratório, desde a receção de matérias-primas, até à libertação de lotes.

##### Serviço de Logística (SL)

É neste serviço que ocorrem a receção dos pedidos, a gestão de stocks e a distribuição dos produtos farmacêuticos. A passagem pelas suas instalações permitiu a compreensão da dinâmica do serviço em relação às matérias-primas e produtos acabados, que permanecem em quarentena até à aprovação por parte do SCQ. A observação dos cofres de metadona

(como MP e como PA), mostra o elevado grau de segurança necessário ter nas instalações onde é guardado este e outros estupefacientes. Por esta razão, são colocados em armazéns seguros, quer pela autorização restrita de entrada, quer pela localização. Também por questões de segurança, são registadas todas as quantidades de estupefacientes utilizadas, quer pelo SP, quer pelo SCQ.

### Serviço de Produção (SP)

A entrada no SP é restrita a pessoas com autorização, nomeadamente, às chefias e aos colaboradores do serviço. Esta restrição de entrada permite manter a segurança, quer ao nível da segregação de acessos de instalações, quer evitando o risco de contaminações na área de produção dos produtos farmacêuticos.

No SP foi possível observar e realizar diversas tarefas relacionadas com a produção dos medicamentos, nomeadamente:

- Cápsulas de carbonato de cálcio;
- Cápsulas de carbonato de magnésio;
- Cápsulas de isoniazida (50 mg e 300 mg);
- Cápsulas de lactato de magnésio;
- Solução estéril de histidinato de cobre;
- Mistura de Bonain (líquido pastoso com cloridrato de cocaína);
- Pasta de cocaína 10 %;
- Solução antisséptica de base de alcoólica (SABA) (etanol 80 % (v/v));
- Solução oral de cloridrato de metadona 1 % (frascos de 1 L);
- Solução oral de cloridrato de metadona (saquetas de dosagens de 30 a 100 mg);
- Testes de identificação de droga;
- Xarope comum com conservantes;
- Xarope comum sem conservantes;
- Xarope de hidrato cloral;
- Xarope de isoniazida.

A produção inicia-se com a pesagem das matérias-primas nas quantidades estipuladas. Segue-se o procedimento, o embalamento primário, rotulagem e embalamento secundário. Os colaboradores, que realizam a produção, possuem um vestuário adequado e obrigatório que inclui bata, touca, luvas e cobertura de sapatos. Durante a produção são feitos todos os registos das etapas realizadas, bem como materiais e equipamentos usados: quantidade pesadas das MPs, lotes e validades das MPs, materiais usados, hora de início e fim de certas

etapas mais prolongadas, etiquetas de limpeza da sala e rótulo do produto. Todas as operações são realizadas por dois colaboradores, um responsável pela execução e outro pela verificação. No fim, procede-se à limpeza dos equipamentos, onde é deixado o registo da última limpeza, quando e quem a realizou.

#### Serviço de controlo de qualidade (SCQ)

Tal como o SP, o SCQ também tem acesso restrito às pessoas que aqui desempenham funções, ou seja, às chefias e colaboradores do serviço. No laboratório de ensaios microbiológicos foi possível observar/realizar as seguintes atividades:

- Produção de meios de cultura – Alguns são comercializados na forma desidratada (pó), sendo solubilizados, autoclavados e distribuídos pelas placas de petri (para meio sólido) ou frascos (para meio líquido). Outros são comercializados de forma sólida em frascos, sendo colocados a fundir e distribuídos por placas.
- GPTs (Growth Promotion Tests) – Testes realizados para validar os meios de cultura rececionados ou produzidos no Laboratório, onde se colocam estirpes de bactérias/fungos conhecidas (*Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*) no meio e, após incubação em condições específicas, verifica-se o crescimento ou inibição do microrganismo, dependendo da especificidade do meio.
- Autoclavagem de material – ciclo de autoclave depende do tipo de material (Anexo 1).
- Análise microbiológica de saquetas (15 mL) e frascos (1L) de cloridrato de metadona – Realizam-se dois ensaios descritos na farmacopeia, o 2.6.12. (contagem de germes totais) e o 2.6.13. (contagem de microrganismos específicos, nomeadamente, *Escherichia coli*). As técnicas usadas estão resumidas no Anexo 2.
- Análise microbiológica de águas de consumo humano – Os microrganismos pesquisados, bem como os meios de cultura usados estão resumidos no Anexo 3.
- Análise microbiológica de águas de piscina – Os microrganismos pesquisados, bem como os meios de cultura usados estão resumidos no Anexo 3.
- Colheita e análise microbiológica de amostras do circuito de água purificada do Laboratório.
- Análise microbiológica de amostras recolhidas em zaragotoas, provenientes da máquina automática de embalagem primário das saquetas de cloridrato de metadona.

- Método de filtração por membrana – método utilizado para todas as amostras (medicamentosas e de águas), em que os microrganismos ficam retidos na membrana filtrante, posteriormente, transferida para as placas de meio de cultura.
- Método de espalhamento de microrganismos em placas.
- Método de isolamento de microrganismos em placas.
- Testes de identificação de colónias – teste da oxidase para coliformes, teste da coagulase para *Staphylococcus spp* e teste da fosfatase ácida para *Clostridium perfringens*.
- Leituras dos meios de cultura – verificação de crescimento nos meios líquidos e contagem de UFCs nas placas de meio sólido.
- Registo de materiais, utilizados durante os procedimentos, e dos resultados, nas folhas de trabalho.
- Observação do funcionamento do programa informático utilizado "e-deia".

O ambiente estéril para realização dos ensaios de controlo microbiológico é proporcionado pela câmara de fluxo laminar ou bico de Bunsen, dependendo do espaço necessário para o ensaio. O controlo de qualidade microbiológico realiza os ensaios em concordância com o descrito na farmacopeia (para a análise de medicamentos) e com o descrito nas ISO e lei portuguesa (Decreto-Lei n.º 152/2017 para águas de consumo humano e Decreto Regulamentar n.º 5/97 para águas de piscina). Os microrganismos que pesquisam, bem como as técnicas utilizadas, estão resumidas nos Anexos 2 e 3. Para além disso, participa num programa de validação externo, seguindo um protocolo com o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge que é a entidade intermediária de amostras padrão, provenientes da *Public Health England* (PHE), e que são enviadas trimestralmente para o Laboratório. O resultado das amostras já é conhecido por parte do PHE, mas não por parte do LMPQF. Após a análise e envio dos resultados obtidos ao PHE, este reenvia ao Laboratório um relatório e classificação, consoante o desempenho do controlo microbiológico das águas.

Quanto ao controlo de qualidade físico-químico, este é realizado nas MPs, PAs e materiais de embalagem. No laboratório de ensaios físico-químicos foi possível observar/realizar as seguintes operações:

- Determinação do pH, viscosidade e densidade relativa de amostras de saquetas e frascos de cloridrato de metadona.
- Verificação do volume total da solução de cloridrato de metadona nas saquetas e frascos.
- Realização do ensaio de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) – Utilizado para identificar e quantificar a substância ativa. Para este ensaio é utilizado um método

interno validado no Laboratório, que se inicia com a verificação da reprodutibilidade, injetando, no HPLC, cinco amostras de padrão, cujo RSD do pico principal deverá ser menor que 0,2. Segue-se a etapa principal do ensaio com 2 injeções do padrão e 4 injeções de cada amostra. Os resultados (área sobre a curva do pico cujo tempo de retenção corresponde ao pico do padrão) são registados num *template excel* que converte a concentração da substância ativa em percentagem. O critério de aceitação para o cloridrato de metadona corresponde a um valor de doseamento compreendido entre 90 % a 110 %.

- Análise de plásticos provenientes de materiais de embalagem de SABA e álcool – A amostra é preparada cortando os plásticos em pequenos pedaços e colocando-os em contacto com água, que é levada a altas temperaturas da autoclave, sendo os ensaios realizados sobre esta água. Os ensaios consistem na determinação do pH, determinação de impurezas (cloretos, sulfatos, bário, metais diversos, sais amoniacais e substâncias redutoras) e análise do resíduo por evaporação. Os resultados são comparados com um branco.
- Seleção dos depósitos para destruição dos reagentes – depósito A (reagentes orgânicos halogenados), depósito B (reagentes mercurados), depósito C (reagentes inorgânicos) e depósito D (reagente orgânico não halogenado).

Nota: É o próprio SCQ que recolhe as amostras, deslocando-se aos locais de colheita, quer as amostras medicamentosas no SP do Laboratório, quer as amostras de água nas diversas instalações do exército. Após análise das mesmas, o SCQ mantém as amostras de cada lote em armazém (farmacoteca), para futura reanálise caso se verifique alguma inconformidade do produto após a sua libertação.

### **3.1.2. Manipulação de medicamentos, exclusivamente, produzidos no LMPQF**

O estágio realizado no LMPQF é singular, uma vez que os produtos farmacêuticos aí produzidos são medicamentos que não existem no mercado farmacêutico, ou seja, não são produzidos nas restantes indústrias, na sua maioria por serem medicamentos “abandonados” cuja produção não tem interesse financeiro, excetuando a solução de cloridrato de metadona (produzida no Laboratório por questões de segurança das instalações) e SABA e álcool (produzidos no Laboratório para apoio ao SNS e Forças Armadas, principalmente na situação pandémica provocada pelo COVID-19), combatendo a escassez destes produtos.

A solução estéril de histidinato de cobre é um exemplo de um dos medicamentos mais importantes produzidos no LMPQF, pela exigência da sua produção e por ser imprescindível à sobrevivência de crianças com doença de Menkes. Trata-se de uma doença hereditária ligada ao cromossoma X, caracterizada por uma deficiência no transporte de cobre no organismo, que se traduz num prognóstico fatal no primeiro ano de vida, se não for tratada. O LMPQF produz este medicamento para três crianças portuguesas com a doença que, de outra forma, dificilmente teriam acesso ao medicamento. A sua produção é realizada em salas de elevada qualidade e que pressupõem vestuário adequado, evitando ao máximo as contaminações.

### **3.1.3. Contacto com diversas áreas da indústria farmacêutica**

As tarefas realizadas no estágio permitiram-me contactar com diversas áreas da indústria farmacêutica e perceber o papel que desempenham, nomeadamente, as áreas de produção, de controlo de qualidade, de gestão e garantia de qualidade e de assuntos regulamentares. Estas últimas duas, apesar de serem as áreas que envolvem mais burocracia, são extremamente importantes numa indústria. No caso do LMPQF, é mais prevalente a área de gestão e garantia de qualidade, de forma a garantir o cumprimento das boas práticas de fabrico, boas práticas de preparação de manipulados, boas práticas de laboratório e de distribuição.

### **3.1.4. Integração de equipas multidisciplinares**

Tanto no SP, como no SCQ, exercem funções profissionais de diferentes áreas, desde engenheiros, biólogos, farmacêuticos, técnicas de farmácia, assistentes de limpeza, entre outros. Apesar dos diferentes níveis de experiência, formação e especialização, os colaboradores do LMPQF complementam os seus conhecimentos e aptidões, por forma a garantir a qualidade dos serviços realizados. A integração nesta equipa multidisciplinar permitiu perceber a importância do bom ambiente de trabalho, boa comunicação e espírito de equipa na vida profissional.

### **3.1.5. Disponibilidade dos profissionais do LMPQF**

A boa integração nas equipas dos serviços de SP e SCQ e o acompanhamento diário por parte dos profissionais do LMPQF constitui um ponto forte do estágio. Independentemente da área de formação ou da responsabilidade das suas funções no LMPQF, todos se demonstraram sempre disponíveis, quer na transmissão de conhecimentos, quer no

esclarecimento de dúvidas, facilitando o processo de aquisição de conhecimentos e competências nesta fase final de formação do MICF.

### **3.1.6. Suporte bibliográfico disponibilizado**

Em toda a duração do estágio foi disponibilizada a bibliografia necessária à melhor consolidação e compreensão de todas as tarefas observadas e/ou desempenhadas. No SP foi possível consultar as GMPs (boas práticas de fabrico), disponíveis no EudraLex, e os procedimentos que descrevem todas as operações que realizam neste serviço. Também no SCQ, foi disponibilizada a 10ª edição da Farmacopeia Europeia (em suporte físico e online), as diversas ISO e Decretos-Lei, nos quais se baseiam os ensaios e procedimentos que realizam. Durante o estágio, os profissionais do LMPQF encorajaram a consulta desta bibliografia, de modo a adquirir autonomia na compreensão das atividades levadas a cabo nestes serviços, mantendo-se sempre disponíveis para o esclarecimento de dúvidas.

### **3.1.7. Reduzida carga burocrática**

Em ambos os serviços, SP e SCQ, a área de gestão e garantia de qualidade está intensamente presente, com o desenvolvimento de procedimentos para todas as operações realizadas. No entanto, a área regulamentar não é tão notória, na medida em que foco do serviço está na produção de medicamentos considerados manipulados. No SCQ, existe um maior grau burocrático, devido à necessidade de emissão de boletins de análise para todas as amostras analisadas, e desenvolvimento de certos processos importantes para garantir a qualidade duradoura dos medicamentos, como por exemplo, estudos de estabilidade. Ainda assim, podendo comparar, superficialmente, com outras indústrias farmacêuticas, é possível concluir que as atividades realizadas no LMPQF apresentam menor carga burocrática.

### **3.1.8. Formação adequada do MICF para a área de indústria farmacêutica**

Ao longo do estágio, não surgiram obstáculos à compreensão das operações realizadas, pelo que os conhecimentos já adquiridos foram suficientes para uma boa integração nas equipas do LMPQF. Grande parte dos conceitos abordados no estágio não foram novidade, o que permitiu aumentar a confiança nas tarefas desempenhadas. Por conseguinte, o curso de MICF oferece uma adequada preparação para uma futura profissão na indústria farmacêutica, seja na produção, controlo de qualidade, assuntos regulamentares ou gestão e garantia de qualidade.

## **3.2. Pontos Fracos**

### **3.2.1. Estágio presencial durante 50 % do tempo**

Devido à situação pandêmica atual, causada pela COVID-19, e ao estado de emergência nacional, que consistiu num período de confinamento e prevalência do teletrabalho, o estágio no LMPQF realizou-se em equipas que funcionaram em espelho, isto é, alternando semanas presenciais no Laboratório com semanas não presenciais. Apesar da elaboração de alguns trabalhos nas semanas de teletrabalho, este fator revelou-se como um inconveniente, uma vez que é presencialmente que adquirimos as competências pretendidas, através do contacto com a profissão farmacêutica. Para além disso, este fator impediu o acompanhamento de algumas operações até ao fim, principalmente no SCQ, tanto microbiológico como físico-químico, uma vez que, nos ensaios de análise às amostras, é necessário cumprir tempos especificados que, muitas vezes, ultrapassaram os 5 dias semanais da presença no LMPQF. Ainda assim, e sendo esta uma situação alheia às decisões do LMPQF, os seus colaboradores fizeram o melhor possível para manter a continuidade dos estágios a decorrer nas suas instalações.

### **3.2.2. Pouca modernização em certas instalações**

O LMPQF, sendo tutelado pelo estado, está dependente do orçamento que o governo disponibiliza para o mesmo. Assim, é necessária uma gestão financeira adequada para garantir que não faltam recursos às atividades diárias do LMPQF. Existem já salas, de produção e de ensaios microbiológicos, de alta qualidade, como exigida nas GMPs, no entanto, não sendo possível uma modernização total repentina, as instalações estão a ser modernizadas gradualmente e o LMPQF está a concentrar os esforços nesse objetivo.

### **3.2.3. Pouca automatização de certos procedimentos**

Alguns procedimentos efetuados no SP e SCQ são pouco automatizados, com parte das etapas realizadas manualmente. Os equipamentos mais inovadores e, conseqüentemente, com maior grau de automatização, existentes no LMPQF, são as máquinas de enchimento das saquetas e frascos de cloridrato de metadona, a máquina de enchimento de SABA e álcool, e a máquina de enchimento das cápsulas de isoniazida. Isto significa que os produtos farmacêuticos produzidos com maior frequência têm processos mais automatizados, reduzindo o tempo necessário à sua produção. No entanto, os medicamentos que são produzidos de forma mais pontual, caracterizam-se por uma produção mais manual, levando ao prolongamento do tempo de produção. Os processos de embalagem secundária e rotulagem ocorrem também, maioritariamente, de forma manual.

### **3.3. Oportunidades**

#### **3.3.1. Conhecimento da profissão de farmacêutico militar**

O estágio no LMPQF permitiu descobrir uma nova área da profissão farmacêutica, já que, pessoalmente, era desconhecida a possibilidade de um farmacêutico civil poder ingressar numa carreira de farmacêutico militar. Esta foi uma das motivações para realizar este estágio e perceber a missão desta profissão.

O farmacêutico militar é um profissional que, para além dos conhecimentos adquiridos ao longo do curso de MICF, deve ter presentes os valores de disponibilidade, disciplina, honra, lealdade e coragem, comuns a todos os elementos das Forças Armadas que frequentam obrigatoriamente a Academia Militar, com o objetivo da aquisição destas valências. A missão de um farmacêutico militar consiste na prestação de serviço em unidades do Exército, exercendo funções de comando, direção ou chefia, e execução, que requeiram elevado grau de conhecimentos de natureza científico-técnica. As atividades desta profissão, dependendo da especialidade exercida, seja ela logística, produção, controlo de qualidade, análises clínicas, farmácia comunitária ou outras, concretizam-se no seguimento da saúde de utentes, prestar apoio a entidades civis ou entidades militares, prestar cuidados e técnicas de saúde, promover a educação para a saúde, garantir periodicamente serviço de escala à unidade, participar em programas de investigação ou de formação para manutenção e atualização dos conhecimentos relacionados com a área profissional, entre outras [5].

Para ter acesso à profissão de farmacêutico militar, é necessário efetivar uma das seguintes opções: na condição de militar, concluir o curso de MICF, mantendo as responsabilidades de militar; ou na condição de civil, completar o curso de MICF e concorrer, posteriormente, à profissão, através da realização de provas obrigatórias, cuja aprovação precede o período de Academia Militar, após o qual o farmacêutico militar está apto a exercer as suas funções.

Cooperar na elaboração da prova de avaliação prática, a ser realizada por candidatos a farmacêuticos militares para o SP, foi uma das oportunidades do estágio, que permitiu perceber a acessibilidade desta profissão. A prova consistiu na preparação de várias formas farmacêuticas, de acordo com o formulário galénico português.

#### **3.3.2. Realização de trabalhos nas semanas não presenciais**

Apesar do estágio decorrer, apenas, 50 % do tempo presencialmente, as semanas de teletrabalho trouxeram a oportunidade de realizar alguns trabalhos para o LMPQF. No SP, foi concretizada a elaboração de um procedimento referente à atribuição de números de lote

dos produtos farmacêuticos produzidos, onde foi sugerido um novo algoritmo de atribuição de números de lote para alguns produtos. No SCQ, mais especificamente no controlo microbiológico, foram elaborados dois procedimentos para testes de identificação de colónias de determinados microrganismos, especificamente, para o teste da coagulase e para o teste da fosfatase alcalina. O teste da coagulase realiza-se para identificar colónias de estafilococos produtores de coagulase e o teste da fosfatase ácida realiza-se para identificar colónias de *Clostridium perfringens*. Para além disso, foi desenvolvido um trabalho sobre a dexametasona, focado em dois pontos principais: o uso deste princípio ativo no tratamento da COVID-19 e a capacidade de produção de cápsulas de dexametasona no LMPQF. Na primeira parte, foi especificado o mecanismo de infeção do SARS-CoV-2 e como o efeito glucocorticoide da dexametasona pode ser útil na redução dos sintomas graves dos doentes infetados. Na segunda parte, foram mencionados os equipamentos e materiais necessários, bem como os procedimentos e os ensaios para o controlo de qualidade das cápsulas, tendo por base a 10ª edição da Farmacopeia Europeia. Por fim, a conclusão do trabalho resume-se na importância de produzir este medicamento no LMPQF e como este tem capacidade produtiva para o fazer. O trabalho foi apresentado à maioria dos colaboradores do SP e SCQ bem como ao Major Farmacêutico Francisco Sampaio e Alferes Farmacêutico António Matias, orientadores do estágio.

### **3.3.3. Reestruturação do LMPQF para Laboratório Nacional do Medicamento**

O Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos sofreu uma reestruturação, em que passará a ser designado de Laboratório Nacional do Medicamento a partir de outubro de 2021. Este novo Estatuto foi publicado em Diário da República a 10 de fevereiro, onde são descritas todas as alterações que esta mudança implicará. Este novo estatuto visa manter as competências únicas do LMPQF, bem como a marca e o logótipo (LM), pelo valor intrínseco que apresenta como património imaterial, distintivo, identificativo e representativo da qualidade. Por outro lado, pretende valorizar a atividade do LMPQF, através do aumento dos recursos e condições materiais e institucionais disponíveis, de forma a alargar a sua capacidade a outras necessidades, não só do Exército, mas também dos outros ramos das Forças Armadas, tornando as compras de medicamentos, dispositivos médicos e outros produtos de saúde centralizadas. Pretende ainda potenciar as relações com o Ministério da Saúde, cooperando no apoio logístico na área do medicamento favorável ao interesse público. Com a transição para Laboratório Nacional do Medicamento, o LM passa a ser um órgão do

Exército, beneficiando de autonomia administrativa e financeira e possuindo o seu próprio património [6]. Uma das oportunidades do estágio foi perceber a importância que esta mudança tem no funcionamento do Laboratório.

### **3.4. Ameaças**

#### **3.4.1. Difícil acesso à profissão de Farmacêutico Militar**

O contacto com a realidade de acesso à profissão de farmacêutico militar, durante o estágio, permitiu considerá-lo um processo moroso, o que pode tornar-se uma ameaça à profissão. Primeiramente, um farmacêutico militar tem de obedecer a requisitos base, nomeadamente: nacionalidade portuguesa, mínimo de 18 anos de idade, aptidão psicofísica adequada, não estar inibido ou interdito do exercício de funções públicas, não ter sido condenado criminalmente em pena de prisão efetiva e possuir habilitações literárias adequadas.

No ingresso via academia, decorre um ano de formação, onde são ministradas, apenas, disciplinas de interesse militar e com uma componente física e prática muito presente. No 2º ano de academia, decorre o ingresso na faculdade e a frequência do MICF em regime de internato na Academia Militar e presencial na FFUL. Durante a formação na faculdade, existe uma componente de aulas, em período extralaboral, de disciplinas de interesse militar, com avaliação teórica e prática.

No ingresso via concurso, os candidatos, já detentores do grau de farmacêutico, têm de realizar provas de classificação e seleção que incluem: prova de aptidão física, prova médica de seleção, prova teórica (exame escrito) e prova prática (exame laboratorial), para além de uma entrevista, onde o candidato deve demonstrar aptidões pessoais para a área funcional a que concorre [7]. Posteriormente, o candidato prossegue para a PAM (Prova de Aptidão Militar), com a duração de 3 a 4 semanas, onde os candidatos têm que demonstrar possuir a capacidade física e mental, assim como os valores necessários para ingressar nos quadros permanentes (QPs) do Exército Português. Após aprovação e mediante classificação, realizam um semestre letivo na Academia Militar, seguindo-se o ingresso nos QPs do Exército.

### **4. Considerações Finais**

Os três meses de estágio no LMPQF constituíram uma mais valia no percurso académico, como complemento aos conhecimentos adquiridos na faculdade e ótima ligação ao ambiente laboral. O balanço é bastante positivo, com diversos pontos fortes e oportunidades, maioritariamente, por ser uma indústria farmacêutica ímpar nas atividades que desempenha, “suprindo as necessidades não cobertas pela indústria farmacêutica e permitindo,

ainda, o incremento do desenvolvimento económico”, bem como promover o “sistema científico e tecnológico nacional no setor do medicamento, incentivando a investigação pública e a inovação terapêutica”, como descrito no preâmbulo do Decreto-Lei n.º 13/2021, de 10 de fevereiro [6].

Também a nível pessoal, o estágio foi muito importante por dar a conhecer uma nova vertente da profissão farmacêutica, por si própria notável, por estar ligada a um estatuto tão admirável como o de militar. Destacar o papel da FFUC, que intermedeia e possibilita a realização de estágios em vertentes menos conhecidas da área farmacêutica, abrindo um leque de oportunidades para os seus alunos. Por outro lado, o facto do estágio ter decorrido em Lisboa e todo o desafio associado às circunstâncias de sair da zona de conforto, foi determinante para elevar a confiança na abordagem da incerteza do futuro.

Como término do estágio, prevalece o sentimento de gratidão por todos os conhecimentos e experiência transmitidos pelos colaboradores do LMPQF.

## 5. Referências Bibliográficas

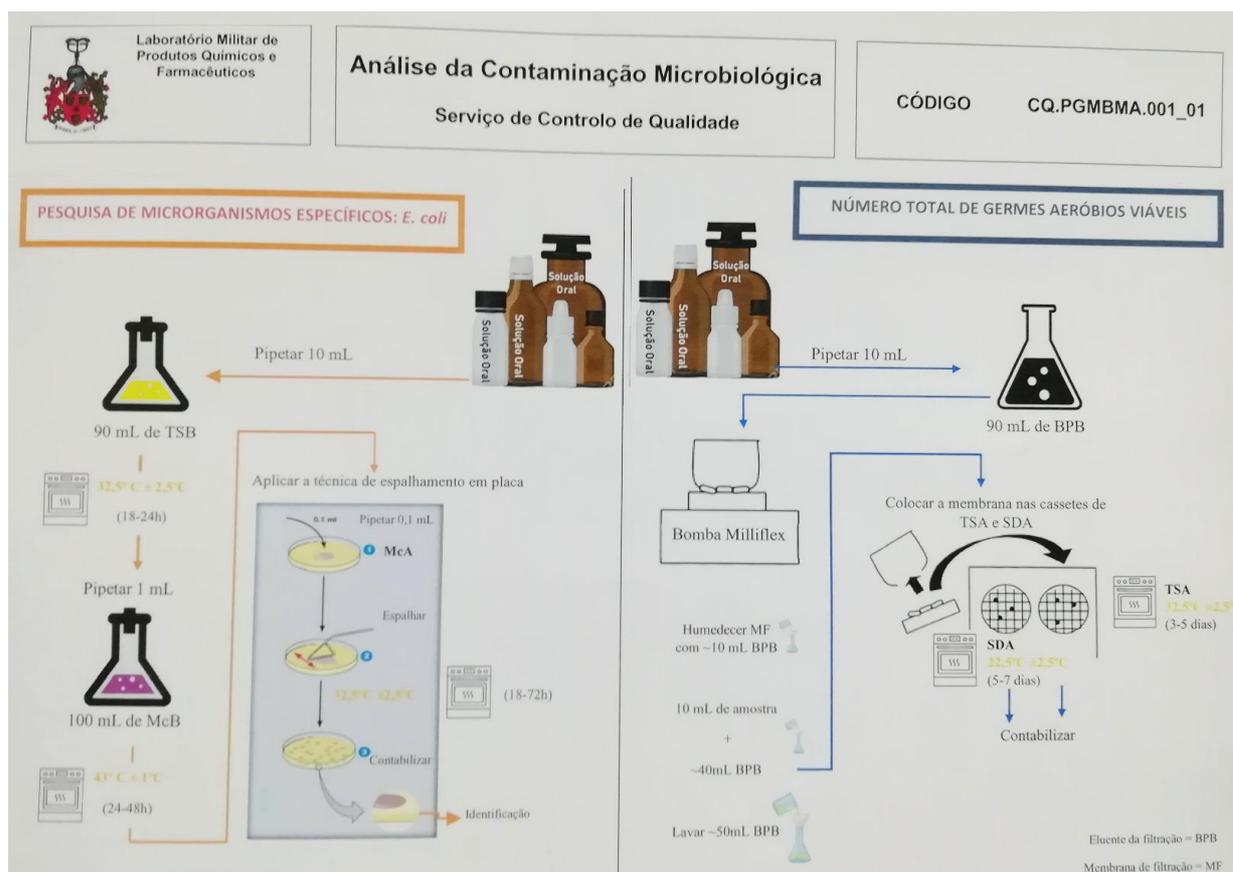
- [1] PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013. *J. Of. da União Eur.*, vol. 354, pp. 132–170, 2013.
- [2] ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Notícia: “Laboratório Militar comemorou centenário.” [Acedido a 31 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://ordemfarmaceuticos.pt/pt/noticias/laboratorio-militar-comemorou-centenario/>
- [3] EXÉRCITO PORTUGUÊS - Comando da Logística. Laboratório Militar de Produtos Químicos e Farmacêuticos. [Acedido a 5 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.exercito.pt/pt/quem-somos/organizacao/ceme/cmdlog/lmpqf>
- [4] INFARMED I.P. - Medicamentos manipulados. [Acedido a 5 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
- [5] RECRUTAMENTO MILITAR - Oficial do Exército, Saúde. [Acedido a 9 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://recrutamentomilitar.bud.gov.pt/profissao/saude>
- [6] DRE - PRESIDÊNCIA DO CONSELHO DE MINISTROS. Decreto-Lei n.º 13/2021 de 10 de fevereiro. *Diário da República - I Série-B*, no. 27, pp. 5–13, 2021.
- [7] EXÉRCITO PORTUGUÊS – Candidatura, Categoria: Oficiais. [Acedido a 10 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.exercito.pt/pt/junta-te/categorias/oficiais>

## 6. Anexos

### Anexo I – Ciclos de autoclavagem do material.

Ciclo	Programa	Tipo	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1	<i>Instruments</i>	Material metálico	134 °C	4'
2	<i>Instruments</i>	Meios de cultura Material Plástico	121 °C	15'
3	<i>Waste</i>	Lixo	121 °C	20'
4	<i>Liquids</i>	Desinfecção (sem secagem)	121 °C	20'
5	<i>Liquids</i>	Líquidos	105 °C	18'
6	<i>Liquids+Cool</i>	Lixo biológico	121 °C	30'

**Anexo 2 –** Esquema de análise microbiológica de amostras provenientes de medicamentos produzidos no LMPQF: ensaio 2.6.12. (contagem de germes totais) e ensaio 2.6.13. (contagem de microrganismos específicos, *Escherichia coli*), segundo a farmacopeia europeia.



### Anexo 3 – Análise microbiológica de águas de consumo e de piscina.

<b>Análise Microbiológica de Águas: Parâmetros por tipo de controle</b>					
<b>Água de consumo humano</b>				<b>Água de piscina</b>	
DS/Entidades/Particulares	Controlo de Rotina 1	Controlo de Rotina 2	Controlo de Inspeção	Profundidade	Superfície
Colónias a 22 °C (Meios)	-	Colónia a 22 °C (YEA)	Colónia a 22 °C (YEA)	-	-
Colónias a 36 °C/37 °C (Meios)	-	Colónia a 36 °C (YEA)	Colónia a 36 °C (YEA)	Colónia a 37 °C (YEA)	-
Bactérias Coliformes (Meios)	Bactérias Coliformes (CCA)	Bactérias Coliformes (CCA)	Bactérias Coliformes (CCA)	Bactérias Coliformes (CCA)	-
<i>E. coli</i> (Meios)	<i>E. coli</i> (CCA)	<i>E. coli</i> (CCA)	<i>E. coli</i> (CCA)	<i>E. coli</i> (CCA)	-
<i>Enterococcus</i> (Meios)	-	<i>Enterococcus</i> (SLN)	<i>Enterococcus</i> (SLN)	<i>Enterococcus</i> (SLN)	-
<i>Clostridium Perfringens</i> (Meios)	-	-	<i>Clostridium Perfringens</i> (TSC)	-	-
Total de Estafilococos Estafilococos produtores de coagulase (Meios)	-	-	-	-	Estafilococos (MSA)
<i>Pseudomonas</i> (Meios)	-	-	-	-	<i>Pseudomonas</i> (PCN)
Cloro livre	Cloro livre	Cloro livre	Cloro livre	-	Cloro
pH	pH	pH	pH	-	pH

#### Meios de cultura:

YEA – Yeast Extract Agar

CCA – Chromogenic Coliform Agar

SLN – Slanetz & Bartley Agar

TSC – Tryptose Sulfite Cycloserine Agar

MSA – Manitol Salt Agar

PCN – Pseudomonas CN Agar

## **Parte 3**

Monografia

**“Vacinas de mRNA:  
Novo paradigma na tecnologia de vacinas”**

Sob orientação da Professora Doutora Olga Borges Ribeiro

## Resumo

As vacinas de ácidos nucleicos, que utilizam como plataforma um RNA mensageiro, codificam um antígeno essencial ao mecanismo de infecção do vírus, contra o qual desencadeiam uma resposta imunitária humoral e celular, que irá atuar rapidamente num futuro contacto com o vírus. A otimização da formulação, quer se trate da própria sequência de RNA, quer seja pela escolha de adjuvantes e, principalmente, pelo desenvolvimento de sistemas nanoparticulares que permitam a libertação controlada e proteção contra a degradação do mRNA, é essencial para promover uma resposta imunológica robusta.

O ano de 2020 veio revolucionar o mundo da vacinação, com a aprovação de duas vacinas de mRNA em menos de um ano, após o início do seu desenvolvimento, a BNT162b2 e a mRNA-1273. A necessidade de controlar a pandemia de COVID-19, impulsionou a aprovação destas vacinas, cujos resultados revelaram importantes vantagens em comparação com outras plataformas, nomeadamente, na tecnologia de produção de vacinas. A transcrição *in vitro* permite que a produção da vacina ocorra sem recurso a células, ovos ou bactérias, tornando-a mais célere e menos dispendiosa.

Alguns dos desafios a ultrapassar passam por melhorar a estabilidade do mRNA, com o desenvolvimento de novas estratégias, como a liofilização, que permitam facilitar o armazenamento das mesmas para condições menos exigentes de temperatura. Também o desenvolvimento de vacinas de mRNA para outras vias de administração, como a intranasal, será vantajoso por permitir a indução de uma resposta imunitária ao nível das mucosas.

Com o desenvolvimento de processos padronizados para a criação de vacinas de mRNA, teoricamente, as indústrias farmacêuticas passam a ter a capacidade fabril de responder rapidamente a situações de emergência de saúde pública, causadas por novos agentes patogénicos ou novas variantes, para além de muitas outras aplicações que uma terapêutica à base de mRNA poderá ter. Nesta fase de comercialização das primeiras vacinas de mRNA, é importante manter a farmacovigilância sobre o produto, de modo a avaliar a imunogenicidade e segurança a longo prazo.

**Palavras-chave:** Vacinas de mRNA, formulação, COVID-19, BNT162b2, mRNA-1273, CVnCoV.

## Abstract

Nucleic acid vaccines, which use a messenger RNA as a platform, encode an antigen essential for the virus infection mechanism, against which they trigger a humoral and cellular immune response that will provide a quick action in a future contact with the virus. The optimization of the formulation, either by RNA sequence, or by addition of adjuvants and, mainly, by the development of delivery systems that allow a controlled release and protection against mRNA degradation, it is essential to promote a robust immune response.

The 2020 year came to revolutionize the world of vaccination with the approval of two mRNA vaccines in less than a year after the beginning of their development, BNT162b2 e mRNA-1273. The need to control the exponential advance of the COVID-19 pandemic boosted the speed of approval of these vaccines and the results revealed important advantages, when compared to other platforms, especially in what concerns to vaccine production technology. *In vitro* transcription allows vaccines production without using cells, eggs or bacteria, making it faster and less expensive.

Some of the challenges to be overcome include improving the stability of the mRNA, with the development of new strategies, such as lyophilization, which allow storage without demanding ultralow temperatures. Also, the development of mRNA vaccines for other routes of administration, such as intranasal, will be advantageous for allowing the induction of an immune response at the mucosal level.

Through the development of standardized processes for the production of mRNA vaccines, theoretically, pharmaceutical industries now have the manufacturing capacity to respond quickly to public health emergencies caused by new pathogens or variants, in addition to many other applications that a mRNA-based therapy have. At this commercialization phase of the first mRNA vaccines, it is important to maintain the pharmacovigilance in order to assess its long-term immunogenicity and safety.

**Keywords:** mRNA vaccines, formulation, COVID-19, BNT162b2, mRNA-1273, CVnCoV.

## **Lista de Abreviaturas/Siglas**

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

COVID-19 – Do inglês, *Coronavirus Disease 2019*

CpG ODN – CpG oligonucleótidos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsRNA – RNA de cadeia dupla

ECA2 – Enzima de Conversão da Angiotensina 2

EMA – Agência Europeia do Medicamento

FDA – Do inglês, *Food and Drug Administration*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

MERS – Síndrome Respiratório do Médio Oriente

MHC I – complexo major de histocompatibilidade classe I

MHC II – complexo major de histocompatibilidade classe II

mRNA – RNA mensageiro

NLRP3 – Do inglês, *NOD-, LRR- and pyrin domain containing protein 3*

NOD – *Nucleotide Oligomerization Domain*

ORFs – Do Inglês, *Open Reading Frames*

PCR – Do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

pDNA – DNA plasmídico

PEG – Polietilenoglicol

PNEs – Proteínas Não Estruturais

RIG – Do inglês, *Retinoic acid-Inducible Gene I*

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAses – Ribonucleases

SARS – Síndrome Respiratório Agudo Severo

SARS-CoV-2 – Do inglês, *Severe Acute Respiratory Coronavirus-2*

ssRNA – RNA de cadeia simples

TLR – Do inglês, *Toll-Like Receptors*

UTRs – Do inglês, *Untranslated Regions*

## I. Introdução

A vacinação é uma medida de saúde pública com elevada importância na sociedade e que tem resultado em inúmeros casos de sucesso ao longo da história [1]. Nenhuma outra medida farmacológica se verifica tão eficaz na redução da taxa de mortalidade [2]. Trata-se de uma intervenção que mimetiza a ação do agente patogénico. As vacinas induzem o nosso sistema imunitário a gerar uma resposta imunológica contra o agente patogénico, sem causar infeção. A prática de vacinação tornou-se a melhor forma de prevenir doenças infecciosas.

Em 1796, um estudo conduzido por Edward Jenner, provou que a inoculação do vírus da varíola bovina (vírus *cowpox*) torna as pessoas inoculadas imunes ao vírus da varíola humana (vírus *smallpox*) o que, posteriormente, deu origem à primeira vacina, a vacina contra a varíola. As grandes campanhas de vacinação, implementadas pela Organização Mundial de Saúde em todo o mundo, permitiram erradicar a varíola em 1980 [3]. De igual modo se prevê que a poliomielite possa ser erradicada num futuro próximo, devido às campanhas de imunização que estão no terreno, em particular onde o poliovírus ainda é endémico [4].

As vacinas existentes no mercado dividem-se em dois grupos, as tradicionais e as de nova geração. As vacinas tradicionais constituem a maioria das vacinas aprovadas, das quais fazem parte as que utilizam o organismo vivo não modificado, o organismo vivo atenuado, o organismo inteiro inativado ou um toxoide. No entanto, as de nova geração correspondem à generalidade das vacinas em investigação, o que significa que as indústrias farmacêuticas e de biotecnologia estão a apostar nestas novas plataformas, nomeadamente, vacinas de vetor viral, de subunidade e de ácidos nucleicos.

Ao longo dos anos, o aumento do conhecimento sobre o DNA (ácido desoxirribonucleico) e o RNA (ácido ribonucleico) permitiu o aparecimento da terapia genética, onde são utilizadas moléculas de ácidos nucleicos como veículos para a transferência de informação genética às células [5]. Nos finais do século XX, o uso destas moléculas em vacinas é uma hipótese que começa a ganhar notabilidade no seio da comunidade científica, por serem moléculas naturalmente imunoestimuladoras e pela facilidade de as obter. Em 1990, foi dado o primeiro passo no desenvolvimento e investigação de vacinas baseadas em ácidos nucleicos, num trabalho realizado por Jon A. Wolff e colaboradores. Os resultados vieram mostrar o potencial terapêutico da administração de ácidos nucleicos, ao detetarem níveis elevados da proteína codificada, após a injeção *in vivo* de vetores de expressão de DNA e RNA no músculo esquelético de ratinho. Este estudo permitiu concluir que os ácidos nucleicos são internalizados pelas células e que o músculo foi o órgão onde ocorreu maior expressão proteica, tendo sido obtidos resultados surpreendentes, o que motivou a contínua

investigação sobre o processo [6]. Com inúmeros estudos desenvolvidos, ensaios pré-clínicos e clínicos, a investigação sobre vacinas de RNA mensageiro (mRNA) tem vindo a demonstrar ser uma terapêutica promissora contra doenças infecciosas e vários tipos de cancro. A primeira vacina de mRNA foi aprovada em dezembro de 2020, contra o vírus SARS-CoV-2 [7].

## 2. Molécula de RNA mensageiro

O RNA é um ácido nucleico de cadeia simples, constituído pelos nucleótidos de adenina, citosina, guanina e uracilo, organizados numa sequência precisa e específica. O RNA mensageiro é uma molécula que desempenha um papel intermédio no dogma central da biologia molecular, hipótese que defende que a informação genética circula num sentido único, começando no DNA que é transcrito em mRNA que, por sua vez, é traduzido em proteínas [8]. Em contraposição ao DNA, o RNA é uma molécula desconhecida para a maioria da população e a sua relevância passa despercebida. No entanto, trata-se de uma peça fundamental na expressão genética, sem qual a mesma não ocorreria.

A transcrição é o processo que dá origem ao pré-mRNA, sintetizado pela enzima RNA polimerase que utiliza como molde o DNA. Após processamento do pré-mRNA, isto é, exclusão das sequências conservadas designadas de intrões e ligação dos exões, obtém-se a molécula de mRNA madura e preparada para ser traduzida em proteínas [9]. O mRNA eucariótico pode dividir-se em três elementos estruturais: a 5' cap, a sequência codificante e uma sequência poli-A terminal. Estas regiões 5' e 3' UTRs (*Untranslated Regions*) não codificam proteínas, mas assumem uma importância crucial na regulação e expressão genéticas. As suas principais funções são o controlo da localização, estabilização e proteção do mRNA, bem como promover a eficiência da tradução [10]. A 5' cap é um resíduo de 7-metil-guanosina localizado na extremidade 5' do mRNA que, para além de estabilizar o RNA, permite ao ribossoma reconhecer a parte inicial da molécula [11]. A sequência poli-A localiza-se na porção terminal 3' do mRNA, é constituída por uma repetição de nucleótidos de adenina (aproximadamente 250 nos mamíferos) [12]. Entre estas porções não codificantes localiza-se a sequência codificante, também designada *Open Reading Frames* (ORFs), que é lida pelo ribossoma e traduzida em proteínas, no citoplasma das células.

### 3. Vacinas de RNA mensageiro

#### 3.1. Mecanismo de ação

Nas vacinas de RNA mensageiro, esta molécula é utilizada como vetor, que codifica proteínas do agente patogénico, crucias ao seu mecanismo de infeção no hospedeiro. Após a administração da vacina, o mRNA entra nas células próximas ao local da injeção e utiliza a maquinaria celular para o traduzir em proteínas. De acordo com a informação codificada pelo mRNA, este pode ser denominado como convencional ou auto-amplificante. O mRNA convencional codifica, apenas, o antígeno de interesse, ao contrário do mRNA auto-amplificante que codifica também proteínas não estruturais (PNEs), baseado no genoma de Alphavirus [13]. As PNEs incluem, proteínas do complexo de replicação, as polimerases de RNA dependentes de DNA e polimerases de RNA dependentes de RNA (replicase), e outras proteínas com função de clivar a poliproteína das PNEs e catalisar a reação que produz a 5' cap. Em conjunto, otimizam a replicação do RNA, dando origem a elevados níveis de proteína (antígeno), com o consequente aumento da estimulação do sistema imunitário [14]. No interior da célula, os antígenos, uma vez processados, dão origem a péptidos (epítomos) com capacidade de se ligarem a moléculas do complexo major de histocompatibilidade de classe I (MHC I), formando complexos que migram até à superfície das células e mantêm o epítomo exposto ao reconhecimento pelas células apresentadoras de antígenos.

Por outro lado, não só as células somáticas são alvo de atuação do mRNA, este tem igualmente a capacidade de estimular diretamente o sistema imunitário, através da identificação por parte dos recetores de reconhecimento de padrões. Estes recetores fazem parte do sistema imunitário inato e são responsáveis, entre outras funções, pela identificação de ácidos nucleicos exógenos. Entre os vários exemplos destes recetores destacam-se os TLR (*Toll-like receptors*), os recetores do tipo RIG (*Retinoic acid-Inducible Gene 1*) e os recetores do tipo NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain*). Estão presentes na membrana plasmática, no citoplasma e na membrana de endossomas de vários tipos de células, especialmente em células apresentadoras de antígeno como células dendríticas, macrófagos e neutrófilos. Os recetores de superfície (TLR 1, 2, 4, 5 e 6) reconhecem moléculas superficiais presentes nos microrganismos, enquanto os recetores presentes em endossomas intracelulares reconhecem ácidos nucleicos, particularmente o TLR9 que deteta DNA exógeno e os TLR 3, 7 e 8 que detetam RNA exógeno [15]. No citoplasma celular, são os recetores do tipo RIG [16] e do tipo NOD [17], que reconhecem o RNA estranho ao organismo.

Nas células apresentadoras de antígeno, os epítomos presentes num antígeno externo, associam-se a moléculas do MHC II, migram para a superfície da célula, ficando exposto a

outras células do sistema imunitário. As células dendríticas têm um papel crucial, por transportarem o antígeno do local da injeção até aos nódulos linfáticos, onde os linfócitos B e T naïves são ativados, através da expressão de fatores co-estimulatórios que, por sua vez facilitam a ligação da célula apresentadora do antígeno aos linfócitos T.

Os linfócitos B são responsáveis pela produção de anticorpos, enquanto os linfócitos T, entre outros, diferenciam-se em CD4+, também designados na língua inglesa de *T helper*, que auxiliam a ativação de mais células do sistema imunitário, e em CD8+, também designados de T citotóxicos, responsáveis pela eliminação de células infetadas. Decorrido algum tempo da administração da vacina, observa-se a presença de anticorpos específicos circulantes e células B e T de memória. Quando em contacto com o microrganismo, contra o qual fomos vacinados, as células de memória respondem rapidamente começando por se multiplicar e, em maior número, permitem a rápida neutralização do agente invasor. Quer as vacinas de mRNA convencional, quer as de mRNA auto-amplificante são capazes de induzir uma resposta imunitária adaptativa, tanto baseada em anticorpos (humoral) como baseada em células (celular) [18].

### **3.2. Alvo a atingir**

As vacinas de mRNA, aprovadas até à data, são administradas pela via intramuscular, no músculo deltoide [19,20], por se verificar uma otimização da imunogenicidade da vacina e minimização das reações adversas neste tecido [21]. Apesar da molécula poder ser expressa noutros tecidos, nomeadamente, células musculares cardíacas, fígado, pele (queratinócitos) e fibroblastos [22], o músculo esquelético apresenta características estruturais, como a presença de células multinucleadas com retículo sarcoplasmático, que lhes confere um elevado nível de expressão [6]. Para além do citoplasma das células musculares, pretende-se que o mRNA atinja as células do sistema imunitário, que afluem ao local da lesão criada pela injeção. Neste ambiente característico de inflamação, as células do sistema imunitário são ativadas, pelo contacto com a formulação da vacina, acelerando o início da resposta imunológica adaptativa [23].

### **3.3. Instabilidade da molécula mRNA**

No meio intracelular, ao contrário do DNA (genoma) cuja concentração não sofre alterações ao longo do ciclo celular, as concentrações de RNA (transcriptoma) e proteínas são variáveis e controladas homeostaticamente, uma vez que o número de genes por célula é fixo, mas a sua expressão varia consoante o tipo de célula e a fase do ciclo celular [24]. Desta

forma, a degradação da molécula de mRNA é um processo natural e necessário para o controlo da expressão genética e do ciclo celular. Sharova e colaboradores descrevem um tempo médio de semi-vida de 7,1 h da molécula de mRNA, segundo uma análise microarray de mRNAs provenientes de células da medula óssea de ratinho. A estabilidade do mRNA relaciona-se, mais significativamente, com características estruturais da molécula do que com a função que desempenham, demonstrando uma correlação positiva com as sequências não codificantes 5'cap e 3' poli A [25].

A instabilidade do mRNA é uma característica que dificulta o percurso da molécula desde o local da injeção até ao interior da célula, durante o qual pode ser degradado por nucleases extracelulares ubíquas e por ribonucleases [25]. As ribonucleases, abreviadas por RNAses, constituem um mecanismo de proteção contra agentes patogénicos, por catalisarem a hidrólise de substratos de RNA exógenos, tanto no meio intracelular, como também no espaço extracelular [26].

### **3.4. Formulação**

A administração intramuscular da vacina liberta o mRNA em profundidade no tecido muscular. Para além da potencial degradação pelas RNAses, o mRNA enfrenta outro desafio até atingir o local de ação, nomeadamente, a passagem através da membrana celular. Este processo é dificultado pelas características físico-químicas da molécula de mRNA, uma vez que o peso molecular elevado (105 Da a 106 Da) e a carga negativa, quer do mRNA, quer da membrana celular, impedem a difusão passiva através dela [25]. A transposição das barreiras mencionadas é determinante para a eficácia da vacina. Embora a molécula de mRNA seja naturalmente imunoestimulante e a injeção de mRNA desprotegido, isto é, sem estar incorporado numa formulação, resulte numa resposta imunitária [6], esta não é robusta. A incorporação da molécula numa formulação, permite a sua libertação controlada, oferece proteção, facilita o transporte até ao citoplasma celular e funciona como adjuvante da vacina [27]. Os sistemas de libertação, desenvolvidos no contexto da administração de mRNA, estão resumidos na Tabela I.

**Tabela 1:** Exemplos de sistemas de libertação, em diferentes fases de investigação e desenvolvimento, utilizados em vacinas com mRNA e respetivos alvos. Incluem a transfecção das células por estímulos físicos (gene gun, sonoforese, microagulhas e eletroporação), a transfecção *ex vivo* de células dendríticas e a encapsulação do mRNA em protamina, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas ou num híbrido.

Sistema de libertação		Alvo da vacina com mRNA
Ensaio pré-clínicos	Gene gun	Injeção de mRNA para correção de mutação genética [28]
	Sonoforese	Injeção de RNA em células da pele [29]
	Microagulhas	
	Encapsulação em nanopartícula polimérica	Vacina contra vírus Influenza [30] Vacina contra HIV [31]
	Encapsulação num híbrido de polímero lipídico	Injeção de mRNA no endotélio pulmonar de rato [32]
Ensaio clínicos	Eletroporação	Vacina contra citomegalovirus [33]
	Transfecção <i>ex vivo</i> de células dendríticas	Vacina contra melanoma [34] Vacina contra tumor cerebral [35] Vacina contra HIV-1 [36]
	Encapsulação em protamina	Vacina contra melanoma [37] Vacina contra a raiva [38] Vacina contra cancro da próstata [39] Vacina contra cancro do pulmão [40]
	Encapsulação em nanopartícula lipídica	Vacina contra o vírus da raiva [41] Vacina contra cancro gastrointestinal [42]
Aprovados	Encapsulação em nanopartícula lipídica	Vacina contra o SARS-CoV-2 [43,44]

Para além destes sistemas de libertação, existem outras substâncias com função de adjuvante ou imunopotenciadoras, que apresentam um uso bem estabelecido em vacinas já licenciadas, como sais de alumínio e MF59, ou em ensaios clínicos, como os CpG oligonucleótidos (CpG ODN) [45].

Os sais de alumínio, como hidróxido de alumínio e hidrogenofosfato de alumínio, atuam por um mecanismo ainda não totalmente compreendido, apesar de serem os primeiros compostos a serem usados como adjuvantes, desde 1926, estudados e introduzidos por Glenny [46]. Uma possível explicação é a indução de um ambiente pro-inflamatório pela via NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain containing protein 3*) [47], e pela secreção dos fatores inflamatórios IL-1 $\beta$  e IL-18 [48].

Os CpG ODN são moléculas constituídas por sequências, geralmente de DNA, contendo nucleótidos de citosina e guanina, que atuam como agonistas dos TLR-9. O reconhecimento da molécula desencadeia a ativação das células do sistema imunitário portadoras desse recetor, o TLR-9 [49]. CpG ODN, constituídos por sequências de RNA, podem ser adicionados ao próprio RNA que constitui a vacina, estimulando recetores como

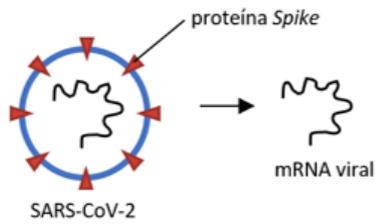
os TLR 3, 7 e 8 [50]. Um ensaio pré-clínico demonstra a vantagem de adicionar este adjuvante a uma vacina de mRNA, desenvolvida contra o SARS-CoV-2 [51], apresentado como uma alternativa às nanopartículas lipídicas utilizadas em ambas as vacinas de mRNA já aprovadas, a Comirnaty® e a SpikeVax®.

O adjuvante MF59, desenvolvido pela Novartis, é uma nanoemulsão óleo/água (o/a) constituída por óleo de esqualeno e uma solução tampão de citrato. Contém ainda dois surfactantes não iônicos, o Tween 80 e o Span 85. Individualmente, estas substâncias não têm função adjuvante, à exceção do Span 85 que contribui para a ativação do transcriptoma muscular, mas quando formuladas sob forma de emulsão o/a, aumentam a imunogenicidade da vacina [52,53]. O MF59 tem sido utilizado em ensaios pré-clínicos de vacinas de mRNA, contra uma de fusão de 3 antigénios, do citomegalovírus humano, do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e do vírus sincicial respiratório [54], e numa vacina contra o HIV [55].

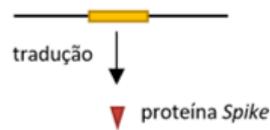
### 3.5. Produção

O método de síntese de mRNA mais utilizado para a incorporação em vacinas é a transcrição *in vitro*, em que o mRNA é produzido a partir de um molde de DNA (DNA plasmídico, pDNA), sem necessidade de recurso a células, bactérias ou ovos, como esquematizado na Figura 1. A construção do pDNA molde é um dos passos mais exigentes e importantes da produção da vacina. O plasmídeo utilizado é, frequentemente, proveniente de uma bactéria, como a *Escherichia coli*, o qual é modificado de modo a conter as sequências de interesse. Ao plasmídeo devem ser adicionados elementos estruturais essenciais, para além do gene codificante do antigénio de interesse, deve conter um promotor a montante com elevada afinidade para RNA polimerases bacterianas, uma sequência terminal rica no nucleótido de timina (que dará origem à sequência poli-A) e um local de restrição [56] (Figura 1). O processo de transcrição é realizado pela polimerase de RNA dependente de DNA, que utiliza os nucleótidos presentes no meio para construir o RNA mensageiro por complementaridade ao DNA molde. Para incrementar a estabilidade da molécula, pode ser adicionada uma cap na extremidade 5' do mRNA, por duas abordagens distintas: adição de um análogo cap ao DNA molde ou por uma reação enzimática pós-transcrição [57]. Por fim, procede-se à purificação do mRNA, eliminando os restantes componentes da reação de transcrição, e à sua incorporação no sistema de libertação pretendido (Figura 1).

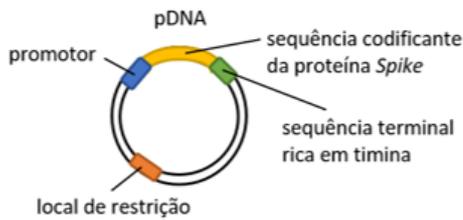
1. Extração e sequenciação do material genético do microrganismo



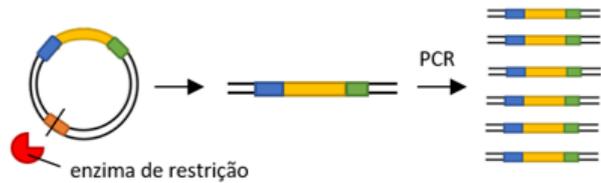
2. Identificação da sequência que codifica o antígeno



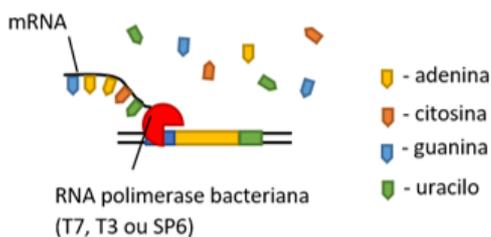
3. Construção do molde de DNA utilizando um plasmídeo



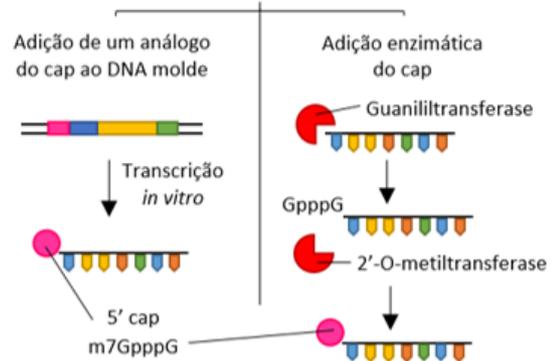
4. Linearização e amplificação do pDNA



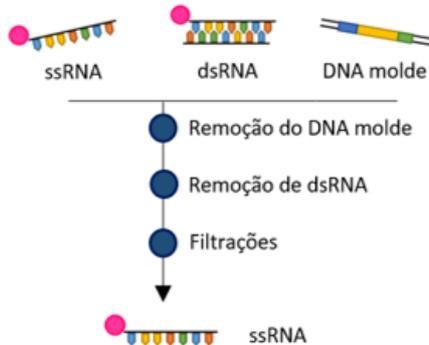
5. Transcrição *in vitro*



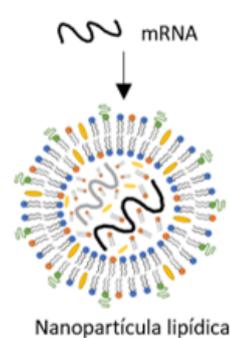
6. Formação da 5' cap



7. Purificação do mRNA



8. Formulação final



**Figura 1:** Esquemática das etapas do processo de produção das vacinas de mRNA aprovadas contra o SARS-CoV-2, Comirnaty® e SpikeVax®, utilizando o método de transcrição *in vitro*. Etapa 1: Extração e sequenciação do material genético do microrganismo, o SARS-CoV-2, que é constituído por um RNA de cadeia simples e positiva. Etapa 2: Identificação da sequência de nucleótidos que codifica o antígeno de interesse para a vacina, nomeadamente, a proteína de superfície, designada de

*Spike* na língua inglesa. **Etapa 3:** Construção do DNA plasmídico (pDNA) que servirá de molde à produção de RNA. O plasmídeo, frequentemente, proveniente da *Escherichia coli*, ao qual devem ser adicionados elementos estruturais essenciais à produção do mRNA, isto é, para além o gene codificante do antigénio de interesse, deve conter um promotor a montante com elevada afinidade para RNA polimerases bacterianas (como a T7, SP6 ou T3), uma sequência terminal rica no nucleótido de timina a jusante, que dará origem à sequência poli-A, e um local de restrição. **Etapa 4:** Linearização e amplificação do pDNA. A enzima de restrição, específica para o local de restrição utilizado, corta o pDNA, tornando-o linear. A tecnologia de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permite a amplificação das moléculas de DNA molde. **Etapa 5:** Transcrição *in vitro*. Nesta etapa, o DNA molde é colocado num *cocktail* de reagentes necessários ao processo de transcrição, entre os quais, nucleótidos de adenina, citosina, guanina e uracilo e a polimerase de RNA bacteriana (T7, T3 ou SP6). A polimerase de RNA reconhece e liga-se ao promotor, desloca-se pelo DNA molde e, por complementaridade, utiliza os nucleótidos disponíveis no meio para sintetizar a molécula de mRNA. **Etapa 6:** Formação da 5' cap, que otimiza a estabilização do mRNA, pode ser conseguida por duas abordagens distintas: adição de um análogo cap, m7GpppG, à sequência de DNA molde, permite a reação de *capping* durante a transcrição, ou através de uma reação enzimática pós-transcrição, utilizando a guanililtransferase e a 2'-O-metiltransferase. **Etapa 7:** Purificação do mRNA de cadeia simples (ssRNA) proveniente da reação de transcrição, consiste na remoção de componentes da reação de transcrição *in vitro*, remoção do DNA molde e de moléculas de RNA de dupla cadeia (dsRNA) formadas espontaneamente por complementaridade. **Etapa 8:** Formulação final, consiste na incorporação do mRNA no sistema de libertação pretendido, no caso das vacinas Comirnaty® e SpikeVax®, numa nanopartícula lipídica.

## 4. Desenvolvimento das primeiras vacinas de mRNA

### 4.1. Pandemia de COVID-19

Desde 1990, apesar de diversos estudos de desenvolvimento e investigação das vacinas de mRNA terem sido realizados, só em 2020 foram aprovadas as primeiras vacinas utilizando esta plataforma. Várias razões podem ser atribuídas a este facto, como a falta de investimento, falta de recursos financeiros e humanos para a realização de ensaios clínicos, a elevada instabilidade da molécula de mRNA e a ineficiente transfecção *in vivo*. O desenvolvimento e aprovação das primeiras vacinas de mRNA foi impulsionado pela COVID-19, doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, que teve os primeiros casos a surgir na cidade chinesa de Wuhan, em dezembro de 2019, mas rapidamente se propagou, resultando numa pandemia a nível mundial [58]. Esta situação emergente desencadeou o impulso final para a introdução das vacinas de mRNA no mercado.

O SARS-CoV-2 é um dos membros da família de coronavírus, notórios por afetarem o sistema respiratório do hospedeiro humano, e causarem as Síndrome Respiratória Aguda Severa (SARS) e a Síndrome Respiratória do Médio Oriente (MERS). O primeiro vírus SARS-CoV foi detetado pela primeira vez em 2002, ano em que provocou uma epidemia, tendo sido identificado não só em humanos, mas também em gatos civetas. Dez anos depois, em 2012, o vírus MERS-CoV foi encontrado em camelos dromedários e humanos infetados, também ele causador de uma epidemia na região oriental. O SARS-CoV-2, detetado em dezembro de 2019, recebe esta designação por ser geneticamente semelhante ao primeiro SARS-CoV,

sendo, por isso, o segundo coronavírus identificado como causador da síndrome SARS. Semelhante aos anteriores coronavírus, a COVID-19 (doença provocada pelo SARS-CoV-2) caracteriza-se por ser uma Zoonose, uma vez que a origem mais provável de infeção em humanos foi a transmissão por um animal, tendo ultrapassado a barreira da espécie. A análise da sequência genética do vírus, sugere que o reservatório inicial de SARS-CoV-2 era uma população de morcegos do género *Rhinolophus*, pela relação genética entre os vírus isolados nos morcegos e nos humanos infetados [59-61].

#### **4.2. Mecanismo de infeção do vírus SARS-CoV-2**

O SARS-CoV-2 é um vírus envelopado de cadeia simples e positiva de RNA que se apresenta com elevado grau de infecciosidade e transmissibilidade devido a diversos fatores, designadamente, o facto da população humana ser completamente naïve a nível imunológico não possuindo qualquer grau de imunização, também pelo facto de privilegiar o sistema respiratório como via de entrada no organismo e a adaptação aos recetores humanos, que permite uma fácil entrada nas células. A proteína de superfície do SARS-CoV-2, designada na língua inglesa de proteína *spike*, é responsável pela entrada do vírus nas células, com a ligação ao recetor celular ECA2 (Enzima de Conversão da Angiotensina 2), abundantemente presente no epitélio respiratório. A proteína *spike* apresenta duas subunidades, geralmente designadas por S1 e S2, e assume uma conformação de pré-fusão metastável, antes de se ligar ao recetor. Após ligação, ocorre fusão do envelope viral com a membrana celular e a consequente libertação do genoma viral para o interior da célula hospedeira [62].

A gravidade da doença deve-se, maioritariamente, à resposta imunológica exagerada, resultado da replicação das partículas virais, o aumento da carga viral, e os danos causados no epitélio pulmonar, que constituem um estímulo constante das células do sistema imunitário presentes no local, com a consequente libertação de citocinas inflamatórias. Origina-se um processo inflamatório exagerado e descontrolado, responsável pelo aparecimento dos sintomas dias após o início da infeção [63].

#### **4.3. Vacinas contra o SARS-CoV-2: BNT162b2, mRNA-1273 e CVnCoV**

Com a evolução exponencial da pandemia tornou-se imperativo agir rápido e desenvolver soluções para reduzir a transmissibilidade e mortalidade provocada pelo vírus SARS-CoV-2. Sabendo que as vacinas são um método eficaz de prevenção de doenças infecciosas, as indústrias farmacêuticas rapidamente se uniram a grandes grupos de investigação de vacinas com o objetivo de identificar o antigénio mais promissor e de selecionar a

plataforma mais adequada para o veicular. Simultaneamente, começaram a ser desenvolvidas diferentes plataformas de vacinas contra o SARS-CoV-2 por diversas indústrias e, surpreendentemente, as primeiras com uso autorizado contra este vírus foram as vacinas de mRNA, nunca antes aprovadas. O conhecimento adquirido nas últimas três décadas sobre estas vacinas de ácidos nucleicos foi canalizado para a situação emergente. Com um grande esforço por parte quer das indústrias, quer dos reguladores do medicamento na Europa e nos Estados Unidos da América, a EMA e a FDA, respetivamente, foi possível desenvolver, aprovar, distribuir e iniciar a administração de uma vacina em, aproximadamente, 1 ano, período volvido entre a descoberta dos primeiros casos de COVID-19 (dezembro de 2019) e a administração da primeira vacina (8 dezembro de 2020) [64]. Na Tabela 2, é feita a comparação entre três vacinas de mRNA, desenvolvidas contra o SARS-CoV-2, a BNT162b2 e a mRNA-1273 já aprovadas, e a CVnCoV que aguarda a decisão de aprovação pela EMA.

O mRNA, presente nas vacinas descritas, codifica uma variante da proteína *Spike*, com duas mutações consecutivas de prolina, que a bloqueiam numa conformação de pré-fusão, estabelecida antes de se ligar ao recetor da célula hospedeira. O objetivo da inoculação deste mRNA é desencadear uma resposta imunológica forte e duradoura, com ativação de células T e B e a produção de anticorpos neutralizantes, que se ligam especificamente a esta variante da proteína, bloqueando o domínio de ligação ao recetor [70,71].

**Tabela 2:** Lista de características das vacinas BNT162b2, mRNA-1273 e CVnCoV, contra o SARS-CoV-2.

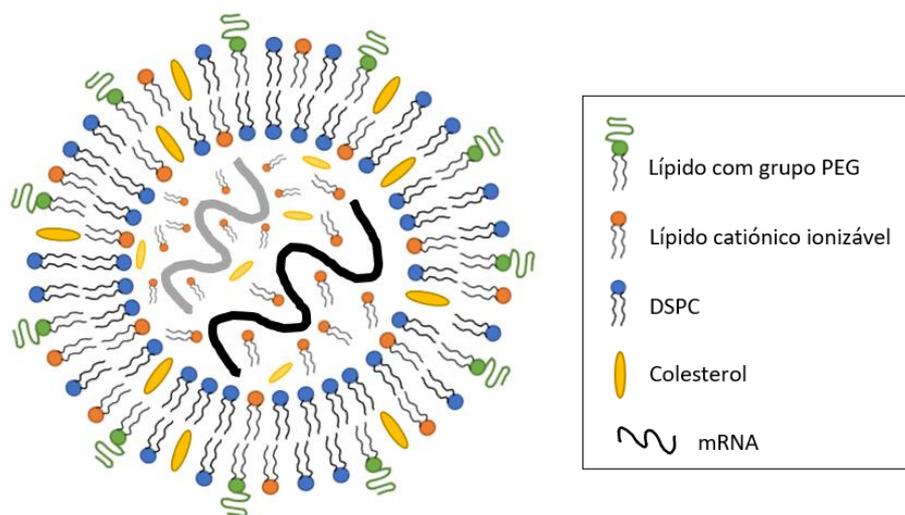
Características	BNT162b2 (Comirnaty®)	mRNA-1273 (SpikeVax®)	CVnCoV
<b>Fabricante</b>	Pfizer & BioNTech	Moderna	CureVac
<b>Fase de desenvolvimento / aprovação</b>	Aprovada com AIM condicional.	Aprovada com AIM condicional.	Aguarda avaliação dos reguladores do medicamento.
<b>Sequência codificante</b>	Proteína <i>Spike</i> do vírus SARS-CoV-2	Proteína <i>Spike</i> do vírus SARS-CoV-2	Proteína <i>Spike</i> do vírus SARS-CoV-2
<b>Alterações na sequência codificante</b>	Duas mutações pontuais que bloqueiam a proteína <i>Spike</i> numa conformação de pré-fusão antigenicamente preferida.	Duas mutações pontuais que bloqueiam a proteína <i>Spike</i> numa conformação de pré-fusão antigenicamente preferida.	Duas mutações pontuais que bloqueiam a proteína <i>Spike</i> numa conformação de pré-fusão antigenicamente preferida.
<b>Tipo de nucleótido</b>	Modificado	Modificado	Não modificado
<b>Sistema de libertação</b>	Nanopartícula lipídica	Nanopartícula lipídica	Nanopartícula lipídica
<b>Otimização do mRNA</b>	5' cap e 3' poli-A	5' cap e 3' poli-A	5' cap e 3' poli-A
<b>Excipientes</b>	ALC-0315 ALC-0159 DSPC Colesterol Cloreto de potássio Fosfato monopotássico Cloreto de sódio Fosfato dissódico di-hidratado Sacarose Água para preparações injetáveis	SM-102 PEG2000 DMG DSPC Colesterol Trometamol Cloridrato de trometamol Ácido acético Acetato de sódio tri-hidratado Sacarose Água para preparações injetáveis	Lípido ionizável Lípido com grupo PEG DSPC Colesterol
<b>Condições de conservação</b>	Entre -90 °C e -60 °C (6 meses)	Entre -25 °C e -15 °C (7 meses)	+5 °C (3 meses)
<b>Modo de administração</b>	2 doses separadas por 21 dias	2 doses separadas por 28 dias	2 doses separadas por 28 dias
<b>mRNA por dose</b>	30 µg	100 µg	12 µg
<b>Eficácia</b>	94,6 %	93,6 %	47 %
<b>Referências</b>	[19,65]	[20,65]	[65-69]
<b>Abreviaturas das substâncias químicas</b>	ALC-0159 – 2-[(polietilenoglicol)-2000]-N,N-ditetradecilacetamida; ALC-0315 – ((4-hidroxibutil)azanodii)bis(hexano-6,1-dii)bis(2-hexildecanoato); DSPC – 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfolina; PEG – polietilenoglicol; PEG2000 DMG – 1,2-dimiristoil-rac-glicero-3 metoxipolietilenoglicol-2000; SM-102 – heptadecan-9-il 8-((2-hidroxi)etil) (6-oxo-6-(undeciloxi)hexil)amino octanoato.		

#### 4.3.1. Formulações das vacinas

A BNT162b2 e a mRNA-1273 utilizam nucleótidos modificados, substituindo os originais nucleótidos de uridina por I-metilpseudouridina. Trata-se de uma forma de alterar e melhorar globalmente a estrutura secundária do RNA sem necessidade de alterar os codões nele existentes. A incorporação destes nucleótidos resulta numa expressão proteica

aumentada e numa resposta imunológica inata amortecida, mas não anulada, uma vez que diminui o reconhecimento do mRNA pelos recetores TLR 7 e 8 [70,72,73]. A vacina CVnCoV utiliza nucleótidos de uridina não modificados, cuja inoculação desencadeia uma maior produção de interferões e citocinas inflamatórias no local que amplificam a resposta inata do sistema imunitário.

Em relação ao sistema de libertação, a tecnologia utilizada pelas três vacinas consiste na encapsulação do mRNA em nanopartículas lipídicas. Esta estrutura potencia a ação da vacina, através da proteção contra a degradação do mRNA pelas RNAses, no auxílio na transfecção das células do hospedeiro por facilitar a entrada do mRNA na célula, e da ação adjuvante, em que a forma particulada de tamanho semelhante aos microrganismos é responsável por incrementar o recrutamento de células do sistema imunitário ao local da injeção, resultando numa inflamação local transitória. As nanopartículas lipídicas são formadas por quatro componentes, dois lípidos funcionais (lípidos com um grupo funcional PEG e lípidos catiónicos ionizáveis) e dois lípidos estruturais (colesterol e fosfolípidos). A disposição dos lípidos e das moléculas de mRNA na nanopartícula lipídica apresenta-se esquematizada na Figura 2. A formação da nanopartícula lipídica envolve um processo de mistura de duas soluções, uma etanólica (que contém os lípidos) e uma aquosa (que contém o mRNA) [74].

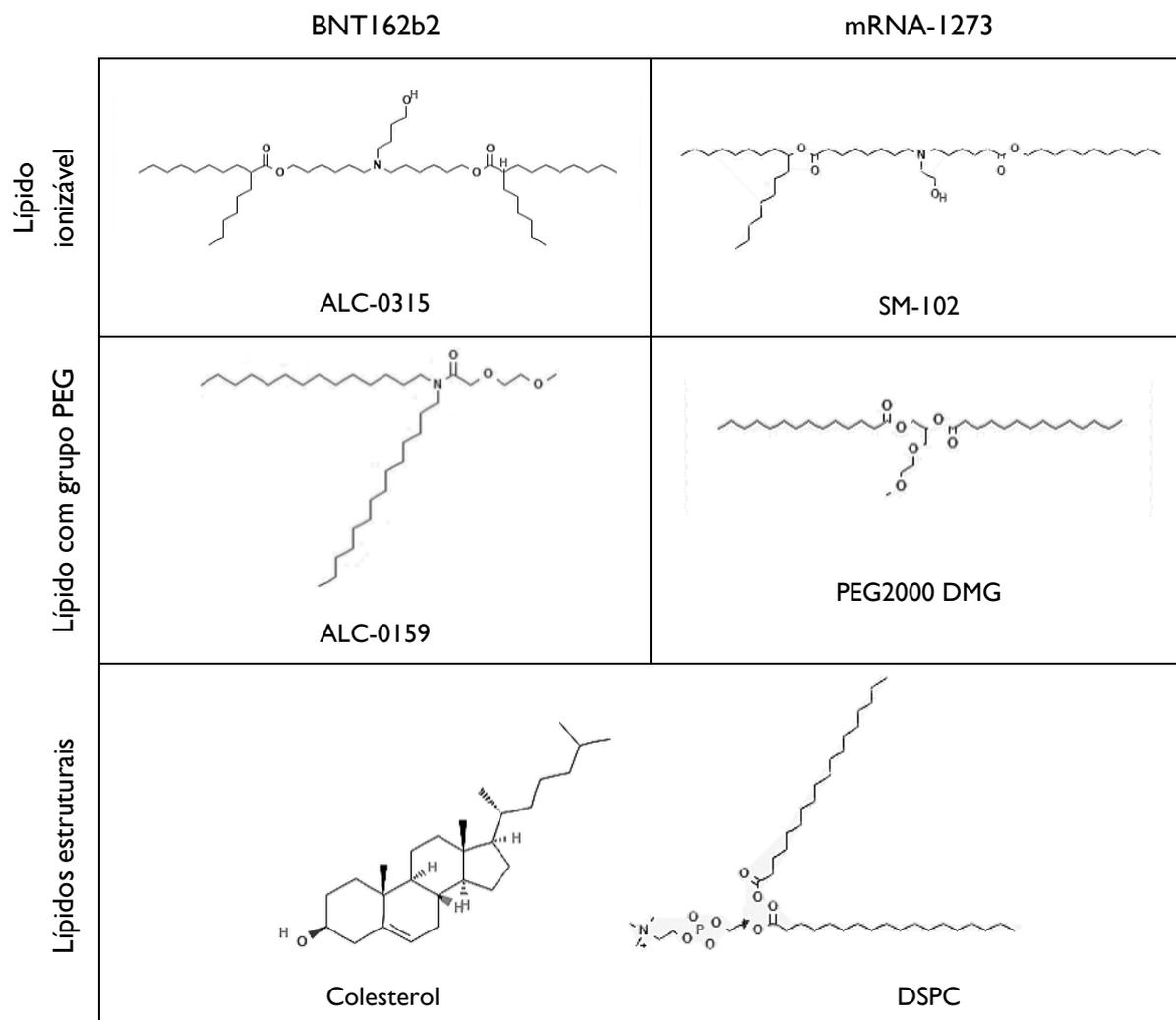


**Figura 2:** Esquematização da nanopartícula lipídica, dos quatro lípidos que a constituem e das moléculas de mRNA no seu interior. Para formar a nanopartícula, procede-se à rápida mistura de duas soluções, aquosa e etanólica, numa proporção de 3:1. Os lípidos estão, inicialmente, solubilizados em etanol, onde o lípido ionizável encontra-se não protonado, e o mRNA está solubilizado na solução aquosa a pH 4. Durante a mistura, o contacto dos lípidos com a solução aquosa leva à insolubilidade dos mesmos, por serem hidrofóbicos, e à com a protonação do lípido ionizável, que adquire carga positiva. Através de forças eletrostáticas, o lípido ionizável, de carga positiva, liga-se ao mRNA, de carga negativa, e, por forças hidrofóbicas, atrai os restantes lípidos, que se organizam em torno do mRNA e formam a nanopartícula lipídica. O pH da solução final é ajustado para 7,4, tornando o lípido ionizável novamente não protonado. O lípido com o PEG orienta este grupo funcional para o exterior, conferindo uma barreira eletrostática hidrofílica que impede a fusão de mais lípidos, estabilizando o tamanho da nanopartícula.

O lípido ionizável é o que mais contribui para liberação do mRNA na célula, através da capacidade de alterar o estado de ionização da molécula com o pH do meio. Devem ser selecionados lípidos ionizáveis com um pKa entre 6 e 7. Na formulação final, com um pH próximo do neutro (pH com valor situado no intervalo de 6,9 a 7,9), o lípido ionizável apresenta carga neutra e, por isso, não protonado. Após a inoculação, a nanopartícula lipídica entra na célula com a formação de um endossoma ao seu redor. No interior desta vesícula, o pH diminui, o que faz com que o lípido ionizável se torne protonado, carregado positivamente, desencadeando a ligação deste à parte aniônica dos fosfolípidos do endossoma, levando à sua ruptura e liberação do mRNA para o citoplasma. O lípido com o grupo funcional PEG, posiciona-se na parte exterior da nanopartícula (Figura 2) e proporciona uma barreira estérica hidrofílica, que facilita a monitorização da homogeneidade e tamanho das partículas, durante a sua produção e armazenamento, fornecendo um exterior hidrofílico à nanopartícula e estabilizando o tamanho desta estrutura. Quanto maior a quantidade de lípido com PEG, menor o tamanho das nanopartículas [70,75]. O colesterol tem uma função de estabilização da nanopartícula, enquanto o fosfolípido DSPC garante o suporte da estrutura em bicamada, criando um lipossoma artificial [76]. Os lípidos utilizados pelas vacinas BNT162b2 e mRNA-1273 estão representados na Figura 3. Em relação à vacina da CureVac, por esta se encontrar, ainda, sob avaliação da EMA [66], não é possível ter acesso a todos os excipientes utilizados na formulação da CVnCoV, mas é possível inferir que a estrutura da nanopartícula lipídica será semelhante às vacinas da Pfizer & BioNTech e da Moderna, uma vez que será composta pelas mesmas categorias de lípidos.

Os lípidos ALC-0315, ALC-0159, SM-102 e PEG-2000 DMG (Figura 3) são novos excipientes, nunca antes utilizados em produtos farmacêuticos aprovados na União Europeia. Desta forma, as características destes excipientes estão descritas, extensivamente, nos documentos necessários à submissão do pedido de AIM [70,71].

Para além dos lípidos, outros excipientes fazem parte da formulação das vacinas (Tabela 2), nomeadamente, sais que constituem a solução tampão, na vacina da Pfizer & BioNTech (cloreto de potássio, fosfato monopotássico, cloreto de sódio e fosfato dissódico di-hidratado) e na vacina da Moderna (cloridrato de trometamol, ácido acético e acetato de sódio tri-hidratado), e a sacarose que atua como um crioprotetor.



**Figura 3:** Lípidos utilizados na nanopartícula lipídica das vacinas BNT162b2 e mRNA-1273. (Imagens adaptadas do website da PubChem [77-82])

#### 4.3.2. Eficácia das vacinas

A vacina da CureVac é a que apresenta menor eficácia de, apenas, 47 %. A vacina da Pfizer & BioNTech e da Moderna apresentam uma eficácia próxima de 95 % e 94 %, respetivamente (Tabela 2). Esta discrepância pode dever-se às diferenças na tecnologia utilizada pela CureVac, no que concerne ao uso de nucleótidos não modificados e uma quantidade de mRNA por dose mais baixa (12 µg) (Tabela 2). Os nucleótidos não modificados provocam uma resposta mais exagerada do sistema imunológico inato, uma menor expressão proteica, a conseqüente diminuição da resposta imunológica adaptativa, e intensificação dos efeitos adversos no local da injeção [83]. Os 12 µg de mRNA por dose demonstraram induzir uma resposta humoral e celular suficientemente robusta em primatas não humanos e mostraram que a vacina é segura e tolerável em humanos [84]. No entanto, esta quantidade administrada não foi suficiente para induzir uma elevada eficácia da vacina. O aumento da

quantidade deste mRNA por dose pode induzir efeitos adversos da vacina mais graves, explicados pela resposta imunológica inata exagerada.

#### **4.3.3. Condições de conservação das vacinas**

As diferenças de temperatura de conservação são notórias entre as três vacinas. Estas são definidas consoante os resultados de ensaios de estabilidade, sensibilidade dos testes realizados e os critérios de aceitação utilizados. A BNT162b2 e a mRNA-1273 podem ser conservadas durante um período máximo de 6 meses, de -90 °C a -60 °C e de -25 °C a -15 °C, respetivamente (Tabela 2). As baixas temperaturas são necessárias para minimizar a degradação do mRNA e das nanopartículas [85]. A este respeito, a CVnCoV apresenta uma grande vantagem em relação às restantes, por poder ser armazenada a 5 °C, temperatura normal de refrigeração de um frigorífico. Trata-se de um aspeto logístico que facilita imensamente o armazenamento e distribuição das vacinas, especialmente em países pobres que não teriam a capacidade de investimento nas infraestruturas necessárias.

### **5. Vantagens e desvantagens das vacinas de mRNA**

As vacinas de mRNA apresentam importantes vantagens, em comparação a outras plataformas, o que contribuiu para que esta fosse a abordagem preferencial no combate à pandemia. No entanto, como qualquer produto farmacêutico, apresenta também potenciais efeitos adversos e desvantagens que, ainda assim, não superam o benefício promovido atualmente por esta nova plataforma de vacinas.

A produção enzimática *in vitro*, sem recurso a células, ovos ou bactérias, revela ser uma vantagem, na medida em que é mais rápida, menos dispendiosa e fácil de transpor para larga escala. Estas características viabilizam a produção das vacinas em diversos pontos do globo, como em países com menos recursos, minimizando muitas das preocupações logísticas associadas à distribuição das vacinas. Por outro lado, o método de produção de transcrição *in vitro* proporciona a rápida capacidade de adaptação do mRNA contra novos agentes patogénicos e novas variantes. Outra vantagem desta plataforma está relacionada com o maior perfil de segurança, uma vez que o mRNA codifica, apenas, a proteína *spike* do vírus, não constituindo um risco de infeção, por ser uma molécula de expressão controlada e limitada no citoplasma, que não entra no núcleo celular e não interfere com o genoma da célula, e por constituir uma molécula não infecciosa, degradada naturalmente. Esta plataforma apresenta, ainda, a possibilidade de integração de múltiplos antígenos numa única molécula de mRNA e num único sistema de libertação.

A instabilidade da molécula do mRNA constitui uma desvantagem desta plataforma, exigindo condições de conservação que requerem equipamentos especializados de armazenamento e distribuição das vacinas, o que resulta num aumento dos custos associados à logística e ao difícil acesso às vacinas de certas regiões do globo. Também a escassez de dados sobre a utilização destas vacinas em humanos, a informação diminuta sobre a imunogenicidade e o perfil de segurança a longo prazo constituem um aspeto negativo desta plataforma.

## **6. Desafios a ultrapassar**

Um dos objetivos a alcançar será facilitar o armazenamento das vacinas de mRNA para condições menos exigentes de temperatura. Este propósito pode ser conseguido com a alteração da forma farmacêutica e, conseqüentemente, da formulação geral da vacina, de uma forma líquida (solução) para uma forma sólida (liofilizado). Sabendo que a presença de água acelera o início das reações de degradação do mRNA, a liofilização pode ser a solução para melhorar a estabilidade da molécula a longo prazo. Já se encontra em ensaios clínicos uma vacina de mRNA desenvolvida pela Moderna, contra o citomegalovírus, formulada num liofilizado, posteriormente reconstituído antes da administração [86].

Outro desafio que pode ser ultrapassado está associado à fraca resposta imunitária ao nível das mucosas, produzida pelas vacinas intramusculares, não sendo suficiente para impedir a entrada e multiplicação do vírus nas células da mucosa nasal, no caso do SARS-CoV-2. Por essa razão, as pessoas vacinadas, embora estejam protegidas contra as formas mais graves da doença, não estão protegidas contra a infeção. Desta forma, utilizar esta plataforma numa vacina nasal permitirá a indução de uma imunidade na mucosa, muito importante quando se trate de agentes patogénicos que entram, preferencialmente, pela via respiratória. Esta via de administração poderá permitir uma eventual administração pelo o próprio [87].

## **7. Conclusões e perspetivas futuras**

Na era tecnológica em que vivemos, a evolução da medicina surpreende-nos todos os dias com descobertas importantes que melhoram a qualidade de vida, face às adversidades que surgem e que afetam a saúde pública. A emergência das vacinas de mRNA veio revolucionar a tecnologia de vacinas em diversos sentidos, principalmente, no que diz respeito à capacidade de rápida adaptação da tecnologia a novos agentes patogénicos ou novas variantes, à rapidez de produção e à eficácia que esta pode apresentar quando otimizada. Com o desenvolvimento de processos padronizados de construção do pDNA e da transcrição *in vitro*, teoricamente,

as indústrias farmacêuticas passam a ter a capacidade fabril de produzir uma vacina rapidamente, para agir em emergências sanitárias, como situações epidêmicas e pandêmicas. O sucesso que as vacinas de mRNA têm demonstrado deve-se, não só às propriedades terapêuticas desta molécula, como também ao mérito das indústrias farmacêuticas que já haviam realizado estudos utilizando o mRNA como plataforma de vacina contra doenças infecciosas e doenças oncológicas, permitindo a estes fabricantes desenvolverem os seus próprios processos padronizados de produção do mRNA e formulação da vacina [88-90].

Nesta fase de comercialização das primeiras vacinas de mRNA, é importante manter a farmacovigilância sobre o produto, de modo a avaliar a imunogenicidade e o perfil de segurança a longo prazo. As propriedades terapêuticas do mRNA estão a revelar-se surpreendentes, não apenas na prevenção de doenças infecciosas, como também no tratamento de doenças oncológicas, autoimunes, raras e outras potenciais aplicações.

A situação atípica vivida nos últimos anos, com o surgimento da COVID-19, já ocorreu, repetidamente, na história da humanidade e, certamente, fará parte do futuro das novas gerações. Tratam-se de situações incontroláveis pelo Homem, ao qual resta retirar o máximo conhecimento dos desafios ultrapassados e saber adaptá-lo aos próximos que virão. As terapêuticas de mRNA em ascensão abrem um caminho de esperança para as doenças já prevalentes, e de segurança para doenças futuramente emergentes.

## Referências Bibliográficas

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - Vaccines and immunization. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: [https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/vaccines-and-immunization#tab=tab_1)
- [2] PLOTKIN S., ORENSTEIN W., OFFIT P. EDWARDS K. - Vaccines. 7ª Edição. Elsevier, Philadelphia, 2018, ISBN: 978-0-323-35761-6.
- [3] RIEDEL S. - Edward Jenner and the History of Smallpox and Vaccination. *Baylor Univ. Med. Cent. Proc.*, vol. 18, no. 1, pp. 21–25, 2005, doi: 10.1080/08998280.2005.11928028.
- [4] BANDYOPADHYAY A., MACKLIN G. - Final frontiers of the polio eradication endgame. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 33, no. 5, pp. 404–410, 2020, doi: 10.1097/QCO.0000000000000667.
- [5] WIRTH T., PARKER N., YLÄ-HERTTUALA S. - History of gene therapy. *Gene*, vol. 525, no. 2, pp. 162–169, 2013, doi: 10.1016/j.gene.2013.03.137.
- [6] WOLFF J., MALONE R., WILLIAMS P., CHONG W., ACSADI G., JANI A., FELGNER P. - Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, vol. 247, 4949, pp. 1465–1468, 1990, doi:10.1126/science.1690918
- [7] UK GOVERNMENT - UK authorises Pfizer/BioNTech COVID-19 vaccine. 2020. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.gov.uk/government/news/uk-authorises-pfizer-biontech-covid-19-vaccine>
- [8] CRICK F., On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.*, vol. 12, pp. 138–63, 1958.
- [9] WILKINSON M., CHARENTON C., NAGAI K. - RNA Splicing by the Spliceosome. *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 89, pp. 359–388, 2020, doi: 10.1146/annurev-biochem-091719-064225.
- [10] PESOLE G., LIUNI S., GRILLO G., LICCIULLI F., MIGNONE F., GISSI C., SACCONI C. - UTRdb and UTRsite: Specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002. *Nucleic Acids Res.*, vol. 30, no. 1, pp. 335–340, 2002, doi: 10.1093/nar/30.1.335.
- [11] ZIEMNIAK M., STREKOWSKA M., KOWALSKA J., JEMIELITY J. - Potential therapeutic applications of RNA cap analogs. *Future Med. Chem.*, vol. 5, no. 10, pp. 1141–1172, 2013, doi: 10.4155/fmc.13.96.
- [12] ECKMANN C., RAMMELT C., WAHLE E. - Control of poly(A) tail length. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 2, no. 3, pp. 348–361, 2011, doi: 10.1002/wrna.56.
- [13] GEALL A., VERMA A., OTTEN G., SHAW C., HEKELE A., BANERJEE K., CU Y., BEARD C., BRITO L., KRUCKER T., O'HAGAN D., SINGH M., MASON P., VALIANTE

- N., DORMITZER P., BARNETT S., RAPPUOLI R., ULMER J., MANDL C. - Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 36, pp. 14604–14609, 2012, doi: 10.1073/pnas.1209367109.
- [14] FROS J., PIJLMAN G. - Alphavirus infection: Host cell shut-off and inhibition of antiviral responses. *Viruses*, vol. 8, no. 6, 2016, doi: 10.3390/v8060166.
- [15] MCGETTRICK A., O'NEILL L. - Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 22, no. 1, pp. 20–27, 2010, doi: 10.1016/j.coi.2009.12.002.
- [16] HORNING V., ELLEGAST J., KIM S., BRZÓZKA K., JUNG A., KATO H., POECK H., AKIRA S., CONZELMANN K., SCHLEE M., ENDRES S., HARTMANN G. - 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science (80-. )*, vol. 314, no. 5801, pp. 994–997, 2006, doi: 10.1126/science.1132505.
- [17] FRANCHI L., WARNER N., VIANI K., NUÑEZ G. - Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol. Rev.*, vol. 227, no. 1, pp. 106–128, 2009, doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x.Function.
- [18] FOTIN-MLECZEK M., DUCHARDT K., LORENZ C., PFEIFFER R., OJKIC-ZRNA S., PROBST J., KALLEN K. Messenger RNA-based vaccines with dual activity induce balanced TLR-7 dependent adaptive immune responses and provide antitumor activity. *J. Immunother.*, vol. 34, no. 1, pp. 1–15, 2011, doi: 10.1097/CJI.0b013e3181f7dbe8.
- [19] INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento -comirnaty. [Acedido a 7 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_Product\\_Information/human/000829/WC500041059.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf)
- [20] INFARMED, I.P. - Resumo das Características do Medicamento - mRNA-1273. [Acedido a 7 de setembro de 2021]. Disponível na Internet: [http://www.ema.europa.eu/docs/pt\\_PT/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000829/WC500041059.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf)
- [21] ZUCKERMAN J. - The importance of injecting vaccines into muscle. Different patients need different needle sizes. *BMJ*, vol. 321, no. 7271, pp. 1237–8, 2000, doi: 10.1136/bmj.321.7271.1237.
- [22] PROBST J., WEIDE B., SCHEEL B., PICHLER B., HOERR I., RAMMENSEE H., PASCOLO S. - Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.*, vol. 14, no. 15, pp. 1175–1180, 2007, doi: 10.1038/sj.gt.3302964.
- [23] HERVÉ C., LAUPÈZE B., GIUDICE G., DIDIERLAURENT A., SILVA F. - The how's and what's of vaccine reactogenicity. *npj Vaccines*, vol. 4, no. 1, 2019, doi: 10.1038/s41541-

019-0132-6.

- [24] PÉREZ-ORTÍN J., TORDERA V., CHÁVEZ S. - Homeostasis in the Central Dogma of molecular biology: the importance of mRNA instability. *RNA Biol.*, vol. 16, no. 12, pp. 1659–1666, 2019, doi: 10.1080/15476286.2019.1655352.
- [25] SHAROVA L., SHAROV A., NEDOREZOV T., PIAO Y., SHAIK N., KO M. - Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.*, vol. 16, no. 1, pp. 45–58, 2009, doi: 10.1093/dnares/dsn030.
- [26] GOTTE G., MENEGAZZI M. - Biological Activities of Secretory RNases: Focus on Their Oligomerization to Design Antitumor Drugs. *Front. Immunol.*, vol. 10, no. November, pp. 1–26, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.02626.
- [27] ALFAGIH I., ALDOSARI B., ALQUADEIB B., ALMURSHEDI A., ALFAGIH M. - Nanoparticles as adjuvants and nanodelivery systems for mRNA-based vaccines. *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 1, pp. 1–27, 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13010045.
- [28] PEKING P., KOLLER U., HAINZL S., KITZMUELLER S., KOCHER T., MAYR E., NYSTRÖM A., LENER T., REICHEL T., BAUER J., MURAUER E. - A Gene Gun-mediated Nonviral RNA trans-splicing Strategy for Col7a1 Repair. *Am. Soc. Gene Cell Ther.*, vol. 5, no. 1 march 2016, 2016, doi: 10.1038/mtna.2016.3.
- [39] RYU Y., KIM D., KIM S., WANG H., HWANG B. - Synergistic Transdermal Delivery of Biomacromolecules Using Sonophoresis after Microneedle Treatment. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, vol. 23, no. 3, pp. 286–292, 2018, doi: 10.1007/s12257-018-0070-6.
- [30] DÉMOULINS T., MILONA P., ENGLEZOU P., EBENSEN T., SCHULZE K., SUTER R., PICHON C., MIDOUX P., GUZMÁN C., RUGGLI N., MCCULLOUGH K. - Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 12, no. 3, pp. 711–722, 2016, doi: 10.1016/j.nano.2015.11.001.
- [31] ZHAO M., LI M., ZHANG Z., GONG T., SUN X. - Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag Mrna. *Drug Deliv.*, vol. 23, no. 7, pp. 2596–2607, 2016, doi: 10.3109/10717544.2015.1038856.
- [32] KACZMAREK J., KAUFFMAN K., FENTON O., SADTLER K., PATEL A., HEARTLEIN M., DEROSA F., ANDERSON D. - Optimization of a Degradable Polymer-Lipid Nanoparticle for Potent Systemic Delivery of mRNA to the Lung Endothelium and Immune Cells,” *Nano Lett.*, vol. 18, no. 10, pp. 6449–6454, 2018, doi: 10.1021/acs.nanolett.8b02917.
- [33] VAN CAMP K., COOLS N., STEIN B., VAN DE VELDE A., GOOSSENS H.,

- BERNEMAN Z., VAN TENDELOO V. - Efficient mRNA electroporation of peripheral blood mononuclear cells to detect memory T cell responses for immunomonitoring purposes. *J. Immunol. Methods*, vol. 354, no. 1–2, pp. 1–10, 2010, doi: 10.1016/j.jim.2010.01.009.
- [34] KYTE J., MU L., AAMDAL S., KVALHEIM G., DUELAND S., HAUSER M., GULLESTAD H., RYDER T., LISLERUD K., HAMMERSTAD H., GAUDERNACK G. - Phase I/II trial of melanoma therapy with dendritic cells transfected with autologous tumor-mRNA. *Cancer Gene Ther.*, vol. 13, no. 10, pp. 905–918, 2006, doi: 10.1038/sj.cgt.7700961.
- [35] CARUSO D., ORME L., NEALE A., RADCLIFF F., AMOR G., MAIXNER W., DOWNIE P., HASSALL T., TANG M., ASHLEY D. - Results of a phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children and young adults with brain cancer. *Neuro. Oncol.*, vol. 6, no. 3, pp. 236–246, 2004, doi: 10.1215/S1152851703000668.
- [36] GANDHI R., KWON D., MACKLIN E., SHOPIS J., MCLEAN A., MCBRINE N., FLYNN T., PETER L., SBROLLA A., KAUFMANN D., PORICHIS F., WALKER B., BHARDWAJ N., BAROUCH D., KAVANAGH D. - Immunization of HIV-1-infected persons with autologous dendritic cells transfected with mRNA encoding HIV-1 Gag and Nef: Results of a randomized, placebo-controlled clinical trial. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, vol. 71, no. 3, pp. 246–253, 2016, doi: 10.1097/QAI.0000000000000852.
- [37] WEIDE B., PASCOLO S., SCHEEL B., DERHOVANESSIAN E., PFLUGFELDER A., EIGENTLER T., PAWELEC G., HOERR I., RAMMENSEE H., GARBE C. - Direct injection of protamine-protected mRNA: Results of a phase I/2 vaccination trial in metastatic melanoma patients. *J. Immunother.*, vol. 32, no. 5, pp. 498–507, 2009, doi: 10.1097/CJI.0b013e3181a00068.
- [38] ALBERER M., GNAD-VOGT U., HONG H., MEHR K., BACKERT L., FINAK G., GOTTARDO R., BICA M., GAROFANO A., KOCH S., FOTIN-MLECZEK M., HOERR I., CLEMENS R., SONNENBURG F. - Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase I clinical trial. *Lancet*, vol. 390, no. 10101, pp. 1511–1520, 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3.
- [39] KÜBLER H., SCHEEL B., GNAD-VOGT U., MILLER K., SCHULTZE-SEEMANN W., DORP F., PARMIANI G., HAMPEL C., WEDEL S., TROJAN L., JOCHAM D., MAURER T., RIPPIN G., FOTIN-MLECZEK M., MÜLBE F., PROBST J., HOERR I., KALLEN K., LANDER T., STENZL A. - Self-adjuvanted mRNA vaccination in advanced prostate cancer patients: A first-in-man phase I/IIa study. *J. Immunother. Cancer*, vol. 3, no. 1, pp.

- 1–14, 2015, doi: 10.1186/s40425-015-0068-y.
- [40] PAPACHRISTOFILOU A., HIPPEL M., KLINKHARDT U., FRÜH M., SEBASTIAN M., WEISS C., PLESS M., CATHOMAS R., HILBE W., PALL G., WEHLER T., ALT J., BISCHOFF H., GEIBLER M., GRIESINGER F., KALLEN K., FOTIN-MLECZEK M., SCHRÖDER A., SCHEEL B., MUTH A., SEIBEL T., STOSNACH C., DOENER F., HONG H., KOCH S., GNAD-VOGT U., ZIPPELIUS A. - Phase Ib evaluation of a self-adjuvanted protamine formulated mRNA-based active cancer immunotherapy, BII361849 (CV9202), combined with local radiation treatment in patients with stage IV non-small cell lung cancer. *J. Immunother. Cancer*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2019, doi: 10.1186/s40425-019-0520-5.
- [41] ALDRICH C., LEROUX-ROELS I., HUANG K., BICA M., LOELIGER E., SCHOENBORN-KELLENBERGER O., WALZ L., LEROUX-ROELS G., SONNENBURG F., OOSTVOGELS L. - Proof-of-concept of a low-dose unmodified mRNA-based rabies vaccine formulated with lipid nanoparticles in human volunteers: A phase I trial. *Vaccine*, vol. 39, no. 8, pp. 1310–1318, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.vaccine.2020.12.070.
- [42] CAFRI G., GARTNER J., ZAKS T., HOPSON K., LEVIN N., PARIAS B., PARKHURST M., YOSSEF R., LOWERY F., JAFFERJI M., PRICKETT T., GOFF S., MCGOWAN C., SEITTER S., SHINDORF M., PARIKH A., CHATANI P., ROBBINS P., ROSENBERG S. - mRNA vaccine-induced neoantigen-specific T cell immunity in patients with gastrointestinal cancer. *J. Clin. Invest.*, vol. 130, no. 11, pp. 5976–5988, 2020, doi: 10.1172/JCI134915.
- [43] POLACK F., THOMAS S., KITCHIN N., ABSALON J., GURTMAN A., LOCKHART D., PEREZ J., MARC G., MOREIRA E., ZERBINI C., BAILEY R., SWANSON K., ROYCHOUDHURY S., KOURY K., LI P., KALINA W., COOPER D., FRENCK JR R., HAMMITT L., TÜRECI Ö., NELL H., SCHAEFER A., ÜNAL S., TRESNAN D., MATHER S., DORMITZER P., SAHIN U., JANSEN K., GRUBER W.; C4591001 Clinical Trial Group. - Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, vol. 383, no. 27, pp. 2603–2615, 2020, doi: 10.1056/nejmoa2034577.
- [44] BADEN L., SAHLY H., ESSINK B., KOTLOFF K., FREY S., NOVAK R., DIEMERT D., SPECTOR S., ROUPHAEL N., CREECH C., MCGETTIGAN J., KHETAN S., SEGALL N., SOLIS J., BROSZ A., FIERRO C., SCHWARTZ H., NEUZIL K., COREY L., GILBERT P., JANES H., FOLLMANN D., MAROVICH M., MASCOLA J., POLAKOWSKI L., LEDGERWOOD J., GRAHAM B., BENNETT H., PAJON R., KNIGHTLY C., LEAV B., DENG W., ZHOU H., HAN S., IVARSSON M., MILLER J., ZAKS T.; COVE Study

- Group. - Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N. Engl. J. Med.*, vol. 384, no. 5, pp. 403–416, 2021, doi: 10.1056/nejmoa2035389.
- [45] U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - Common Ingredients in U.S. Licensed Vaccines. [Acedido a 3 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/safety-availability-biologics/common-ingredients-us-licensed-vaccines>
- [46] GLENNY A., POPE C., WADDINGTON H., WALLAC U. - Immunological notes XVII.-XXIV. *J. Pathol. Bacteriol.*, vol. 29, no. 1, pp. 31–40, 1926.
- [47] KOOL M., PÉTRILLI V., DE SMEDT T., ROLAZ A., HAMMAD H., VAN NIMWEGEN M., BERGEN I., CASTILLO R., LAMBRECHT B., TSCHOPP J. - Cutting Edge: Alum Adjuvant Stimulates Inflammatory Dendritic Cells through Activation of the NALP3 Inflammasome. *J. Immunol.*, vol. 181, no. 6, pp. 3755–3759, 2008, doi: 10.4049/jimmunol.181.6.3755.
- [48] LI H., NOOKALA S., RE F. - Aluminum Hydroxide Adjuvants Activate Caspase-1 and Induce IL-1 $\beta$  and IL-18 Release - *J. Immunol.*, vol. 178, no. 8, pp. 5271–5276, 2007, doi: 10.4049/jimmunol.178.8.5271.
- [49] ILVESARO J., MERRELL M., LI L., WAKCHOURE S., GRAVES D., BROOKS S., RAHKO E., JUUKOLA-VUORINEN A., VUOPALA K., HARRIS K., SELANDER K. - Toll-like receptor 9 mediates CpG oligonucleotide-induced cellular invasion - *Mol. Cancer Res.*, vol. 6, no. 10, pp. 1534–1543, 2008, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-2005.
- [50] SUGIYAMA T., GURSEL M., TAKESHITA F., COBAN C., CONOVER J., KAISHO T., AKIRA S., KLINMAN D., ISHII K. - CpG RNA: Identification of Novel Single-Stranded RNA That Stimulates Human CD14 + CD11c + Monocytes - *J. Immunol.*, vol. 174, no. 4, pp. 2273–2279, 2005, doi: 10.4049/jimmunol.174.4.2273.
- [51] HAABETH O., LOHMEYER J., SALLET A., BLAKE T., SAGIV-BARFI I., CZERWINSKI D., MCCARTHY B., POWELL A., WENDER P., WAYMOUTH R., LEVY R. - An mRNA SARS-CoV-2 Vaccine Employing Charge-Altering Releasable Transporters with a TLR-9 Agonist Induces Neutralizing Antibodies and T Cell Memory - *ACS Cent. Sci.*, vol. 7, no. 7, pp. 1191–1204, 2021, doi: 10.1021/acscentsci.1c00361.
- [52] CALABRO S., TRITTO E., PEZZOTTI A., TACCONE M., MUZZI A., BERTHOLET S., GREGORIO E., O'HAGAN D., BAUDNER B., SEUBERT A. - The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine*, vol. 31, no. 33, pp. 3363–3369, 2013, doi: 10.1016/j.vaccine.2013.05.007.
- [53] FOX C., BALDWIN S., VEDVICK T., ANGOV E., REED S. - Effects on immunogenicity

- by formulations of emulsion-based adjuvants for malaria vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 19, no. 10, pp. 1633–1640, 2012, doi: 10.1128/CVI.00235-12.
- [54] BRITO L., CHAN M., SHAW C., HEKELE A., CARSILLO T., SCHAEFER M., ARCHER J., SEUBERT A., OTTEN G., BEARD C., DEY A., LILJA A., VALIANTE N., MASON P., MANDL C., BARNETT S., DORMITZER P., ULMER J., SINGH M., O'HAGAN D., GEALL A. - A cationic nanoemulsion for the delivery of next-generation RNA vaccines. *Mol. Ther.*, vol. 22, no. 12, pp. 2118–2129, 2014, doi: 10.1038/mt.2014.133.
- [55] BOGERS W., OOSTERMEIJER H., MOOJI P., KOOPMAN G., VERSCHOOR E., DAVIS D., ULMER J., BRITO L., CU Y., BANERJEE K., OTTEN G., BURKE B., DEY A., HEENEY J., SHEN X., TOMARAS G., LABRANCHE C., MONTEFIORI D., LIAO H., HAYNES B., GEALL A., BARNETT S. - Potent immune responses in rhesus macaques induced by nonviral delivery of a self-amplifying RNA vaccine expressing HIV type 1 envelope with a cationic nanoemulsion. *J. Infect. Dis.*, vol. 211, no. 6, pp. 947–955, 2015, doi: 10.1093/infdis/jiu522.
- [56] KANWAL F., CHEN T., ZHANG Y., SIMAIR A., RUJIE C., ZAIDI N., GUO X., WEI X., SIEGEL G., LU C. - Large-Scale in Vitro Transcription, RNA Purification and Chemical Probing Analysis. *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 48, no. 5, pp. 1915–1927, 2018, doi: 10.1159/000492512.
- [57] MUTTACH F., MUTHMANN N., RENTMEISTER A. - Synthetic mRNA capping. *Beilstein J. Org. Chem.*, vol. 13, pp. 2819–2832, 2017, doi: 10.3762/bjoc.13.274.
- [58] WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - WHO/Europe | Coronavirus disease (COVID-19) outbreak - About the virus. [Acedido a 6 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.euro.who.int/en/health-topics/health-emergencies/coronavirus-covid-19/novel-coronavirus-2019-ncov>
- [59] CUI J., LI F., SHI Z. - Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 17, no. 3, pp. 181–192, 2019, doi: 10.1038/s41579-018-0118-9.
- [60] KIRTIPAL N., BHARADWAJ S., KANG S. - From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infect. Genet. Evol.*, vol. 85, no. August, p. 104502, 2020, doi: 10.1016/j.meegid.2020.104502.
- [61] WORLD HEALTH ORGANIZATION - Origin of SARS-CoV-2. 2020. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.who.int/publications/i/item/origin-of-sars-cov-2>
- [62] LAN J., GE J., YU J., SHAN S., ZHOU H., FAN S., ZHANG Q., SHI X., WANG Q., ZHANG L., WANG X. - Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor - *Nature*, vol. 581, no. 7807, pp. 215–220, 2020, doi:

10.1038/s41586-020-2180-5.

- [63] FU Y., CHENG Y., WU Y. - Understanding SARS-CoV-2-Mediated Inflammatory Responses: From Mechanisms to Potential Therapeutic Tools. *Virologica Sinica*, vol. 35, no. 3, pp. 266–271, 2020, doi: 10.1007/s12250-020-00207-4.
- [64] NHS ENGLAND - Landmark moment as first NHS patient receives COVID-19 vaccination - [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.england.nhs.uk/2020/12/landmark-moment-as-first-nhs-patient-receives-covid-19-vaccination/>
- [65] WORLD HEALTH ORGANIZATION - COVID-19 vaccine tracker and landscape. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
- [66] EUROPEAN MEDICINES AGENCY - EMA starts rolling review of CureVac's COVID-19 vaccine (CVnCoV). [Acedido a 5 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-starts-rolling-review-curevacs-covid-19-vaccine-cvncov>
- [67] CUREVAC - CureVac Provides Update on Phase 2b/3 Trial of First-Generation COVID-19 Vaccine Candidate, CVnCoV. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.curevac.com/en/2021/06/16/curevac-provides-update-on-phase-2b-3-trial-of-first-generation-covid-19-vaccine-candidate-cvncov/>
- [68] CUREVAC - CureVac's COVID-19 Vaccine Candidate, CVnCoV, Suitable for Standard Fridge Temperature Logistics. [Acedido a 28 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.curevac.com/en/2020/11/12/curevacs-covid-19-vaccine-candidate-cvncov-suitable-for-standard-fridge-temperature-logistics/>
- [69] RAUCH S., ROTH N., SCHWENDT K., FOTIN-MLECZEK M., MUELLER S., PETSCH B. - mRNA-based SARS-CoV-2 vaccine candidate CVnCoV induces high levels of virus-neutralising antibodies and mediates protection in rodents. *npj Vaccines*, vol. 6, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41541-021-00311-w.
- [70] EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Assessment report: COVID-19 Vaccine Comirnaty. *EMA/707383/2020 Corr.1\**, 2021. [Acedido a 6 de setembro de 2021] Disponível na Internet: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- [71] EUROPEAN MEDICINES AGENCY - Assessment report: COVID-19 Vaccine Moderna. [Acedido a 6 de setembro de 2021] Disponível na Internet: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf)

- [72] MAUGER D., CABRAL B., PRESNYAK V., SU S., REID D., GOOMAN B., LINK K., KHATWANI N., REYNDERS J., MOORE M., MCFADYEN I. - mRNA structure regulates protein expression through changes in functional half-life. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 48, pp. 24075–24083, 2019, doi: 10.1073/pnas.1908052116.
- [73] SCHWARTZ S., BERNSTEIN D., MUMBACH M., JOVANOVIC M., HERBST R., LEÓN-RICARDO B., ENGREITZ J., GUTTMAN M., SATIJA R., LANDER E., FINK G., REGEV A. - Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, vol. 159, no. 1, pp. 148–162, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2014.08.028.Transcriptome-wide.
- [74] KULKARNI J., DARJUAN M., MERCER J., CHEN S., MEEL R., THEWALT J., TAM Y., CULLIS P. - On the Formation and Morphology of Lipid Nanoparticles Containing Ionizable Cationic Lipids and siRNA. *ACS Nano*, vol. 12, no. 5, pp. 4787–4795, 2018, doi: 10.1021/acsnano.8b01516.
- [75] CULLIS P., HOPE M. - Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies. *Mol. Ther.*, vol. 25, no. 7, pp. 1467–1475, 2017, doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.013.
- [76] PARDI N., HOGAN M., PORTER F., WEISSMAN D. - mRNA vaccines: a new era in vaccinology. *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 17, no. 4, pp. 261–279, 2018, doi: 10.1038/nrd.2017.243.
- [77] PUBCHEM. - ((4-Hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl) bis(2-hexyldecanoate) | C48H95NO5. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/122666778>
- [78] PUBCHEM. - Heptadecan-9-yl 8-((2-hydroxyethyl)(6-oxo-6-(undecyloxy)hexyl)amino) octanoate | C44H87NO5. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/126697616>
- [79] PUBCHEM. - mPEG-N,N-Ditetradecylacetamide. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/441585695>
- [80] PUBCHEM. - 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-methoxypolyethylene glycol 2000 | C34H66O6. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10257450>
- [81] PUBCHEM. - Cholesterol | C27H46O. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5997>
- [82] PUBCHEM. - 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine | C44H88NO8P. [Acedido a 7 de setembro de 2021] Disponível na Internet: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/94190>
- [83] PARDI N., HOGAN M., NARADIKIAN M., PARKHOUSE K., CAIN D., JONES L.,

- MOODY M., VERKERKE H., MYLES A., WILLIS E., LABRANCHE C., MONTEFIORI D., LOBBY J., SAUNDERS K., LIAO H., KORBER B., SUTHERLAND L., SCEARCE R., HRABER P., TOMBÁČZ I., MURAMATSU H., NI H., BALIKOV D., LI C., MUI B., TAM Y., KRAMMER F., KARIKÓ K., POLACINO P., EISENLOHR L., MADDEN T., HOPE M., LEWIS M., LEE K., HU S., HENSLEY S., CANCRO M., HAYNES B., WEISSMAN D. - Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses. *J. Exp. Med.*, vol. 215, no. 6, pp. 1571–1588, 2018, doi: 10.1084/jem.20171450.
- [84] RAUCH S., GOOCH K., HALL Y., SALGUERO F., DENNIS M., GLEESON F., HARRIS D., HO C., HUMPHRIES H., LONGET S., NGABO D., PATERSON J., RAYNER E., RYAN K., SHARPE S., WATSON R., MUELLER S., PETSCH B., CARROLL M. - mRNA vaccine CVnCoV protects non-human primates from SARS-CoV-2 challenge infection. *bioRxiv*, 2020, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.12.23.424138>
- [85] SCHOENMAKER L., WITZIGMANN D., KULKARNI J., VERBEKE R. - mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines : Structure and stability. 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120586>.
- [86] NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. - Dose-Finding Trial to Evaluate the Safety and Immunogenicity of Cytomegalovirus (CMV) Vaccine mRNA-1647 in Healthy Adults - Full Text View - ClinicalTrials.gov. [Acedido a 3 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04232280>
- [87] LI M., ZHAO M., FU Y., LI Y., GONG T., ZHANG Z., SUN X. - Enhanced intranasal delivery of mRNA vaccine by overcoming the nasal epithelial barrier via intra- A nd paracellular pathways. *J. Control. Release*, vol. 228, pp. 9–19, 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.02.043.
- [88] BIONTECH - mRNA therapeutics | BioNTech. [Acedido a 8 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://biontech.de/how-we-translate/mrna-therapeutics>
- [89] MODERNA - Intellectual Property: Advancing mRNA Science. [Acedido a 8 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.modernatx.com/mrna-technology/modernas-intellectual-property>
- [90] CUREVAC - Technology. [Acedido a 8 de agosto de 2021] Disponível na Internet: <https://www.curevac.com/en/technology/>