



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Gonçalo Simões Rocha

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Microfluidics: A Novel Method for Large-Scale Manufacturing of Liposome-Based Vaccines” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dr. João Manuel Baliza Santiago Maia, do Dr. Tobias Daniel Cruz Leite e Silva e do Professor Doutor Luís Maria Marques dos Santos Bimbo, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Gonçalo Simões Rocha

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Microfluidics: A Novel Method for Large-Scale Manufacturing of Liposome-Based Vaccines” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação do Dr. João Manuel Baliza Santiago Maia, do Dr. Tobias Daniel Cruz Leite e Silva e do Professor Doutor Luís Maria Marques dos Santos Bimbo, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021

Eu, Gonçalo Simões Rocha, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016233308, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia Intitulada “Microfluidics: A Novel Method for Large-Scale Manufacturing of Liposome-Based Vaccines” 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, 28 de outubro de 2021.

Gonçalo Simões Rocha

(Gonçalo Simões Rocha)

Agradecimentos

Ao meu pai e à minha mãe, pelo apoio, paciência e amor incondicionais

Ao meu irmão, pela amizade e certeza de um eterno porto-de-abrigo

Às minhas avós, por todo o carinho colocado em tudo aquilo que me deram

Ao meu avô Joaquim, por continuar a guiar o meu caminho

À Adriana, por tornar os dias mais bonitos e fazer de mim alguém melhor

Aos Cabides, por fazerem destes anos memórias que guardarei para a vida

À Irmandade de Umbría, por todo o apoio e amizade, um obrigado nunca será suficiente

Aos Cifrão Profundo, por toda a vida que partilhámos juntos

Aos Benguidex, por todos os momentos e histórias partilhadas

À Imperial TAFFUC, por ser a minha segunda família que me encheu o coração e deu significado a todos estes anos de vida académica

Ao Chef Duro e restantes Adversários, por todas as aventuras vividas e amizade

Aos TC's, pelos jantares de reunião e companheirismo

A todos os amigos e amigas que Coimbra me deu a oportunidade de conhecer

À equipa da Farmácia Machado, por todos os ensinamentos, carinho e amizade

Ao Dr. Tobias Leite e Silva, pela oportunidade, acompanhamento e conhecimentos transmitidos

Ao Professor Doutor Luís Bimbo, por todo o apoio e orientação

Ao Professor Doutor Sérgio Simões, por toda a disponibilidade, atenção e ajuda

A Coimbra, “cidade de fitas”, por todas as “memórias” que, apesar de não haver, me fazem acreditar que “pró ano há mais”

Índice

PARTE I – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas	7
1. Introdução	8
2. Análise SWOT	9
2.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	9
2.1.1. Boa Receção e Integração do Estagiário na Equipa.....	9
2.1.2. Equipa Técnica.....	10
2.1.3. Localização e Utentes Fidelizados.....	11
2.1.4. Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro (LPCC)	11
2.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	12
2.2.1. Preparação de Manipulados.....	12
2.2.2. Erros de <i>Stock</i>	12
2.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	13
2.3.1. Formações de Especialização	13
2.3.2. Cartão Saúde	13
2.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	14
2.4.1. Medicamentos Esgotados no Mercado	14
2.4.2. Locais de Venda de MNSRM.....	14
2.4.3. Pandemia COVID-19	15
3. Casos Práticos	16
3.1. Contraceção Oral de Emergência (COE)	16
3.2. <i>Cross-selling</i>	17
3.3. Uso Irrracional de Antibióticos	17
4. Considerações Finais	18
5. Bibliografia	20

PARTE II – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de Abreviaturas	22
1. Introdução	23
2. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.	23
2.1. Enquadramento na Bluepharma e Acolhimento, Apresentação Geral das Atividades e Responsabilidades do Departamento	23
2.1.1. Apresentação da Bluepharma	23
2.1.2. Acolhimento	25
2.1.3. Apresentação Geral do Departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto (Atividades e Responsabilidades).....	25
3. Análise SWOT	26
3.1. Pontos Fortes (<i>Strengths</i>)	26
3.1.1. Receção e Integração do Estagiário na Empresa	26
3.1.2. Formação do Estagiário.....	27
3.1.3. Contacto com Grandes Empresas Farmacêuticas.....	27
3.1.4. Desenvolvimento de Competências ao Nível da Língua Inglesa.....	28

3.1.5. Valorização do Estagiário.....	28
3.1.6. Contacto com Bases de Dados Relevantes na Área de <i>Competitive Intelligence</i> , Propriedade Intelectual e Análise do Mercado Farmacêutico	29
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	29
3.2.1. Duração do Estágio.....	29
3.2.2. Visão Reduzida da Indústria Farmacêutica.....	29
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	30
3.3.1. Teletrabalho.....	30
3.3.2. Evento Virtual “DCAT Week”	31
3.3.3. Competitividade no Setor Farmacêutico	31
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>).....	32
3.4.1. Estágio Não Creditado.....	32
4. Considerações Finais	33
5. Bibliografia.....	34

PARTE III – Monografia “Microfluidics: A Novel Method for Large-Scale Manufacturing of Liposome-Based Vaccines

Abstract	36
Resumo	36
Abbreviations.....	37
1. Introduction	39
2. Research Methodology.....	43
3. Critical Analysis.....	44
3.1. Breakthrough of Liposomes as Vaccine Adjuvants.....	44
3.2. Current Development in Microfluidic Methods and Devices.....	47
4. Summary.....	57
5. Conclusions.....	61
6. References.....	62

PARTE I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Machado

Sob orientação do Dr. João Manuel Baliza Santiago Maia

Lista de Abreviaturas

COE – Contraceção Oral de Emergência

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

EC – Estágio Curricular

FC – Farmácia Comunitária

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IPOCFG – Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil

IU – Infecção Urinária

LPCC – Liga Portuguesa Contra o Cancro

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM – Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM – Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

UC – Unidade Curricular

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) prepara o estudante, enquanto futuro farmacêutico, para desempenhar a sua função enquanto profissional de saúde nas diversas saídas profissionais que o MICF abrange. A Farmácia Comunitária (FC) representa uma das áreas profissionais que muitos farmacêuticos enveredam, sendo uma das mais importantes para o Sistema Nacional de Saúde.

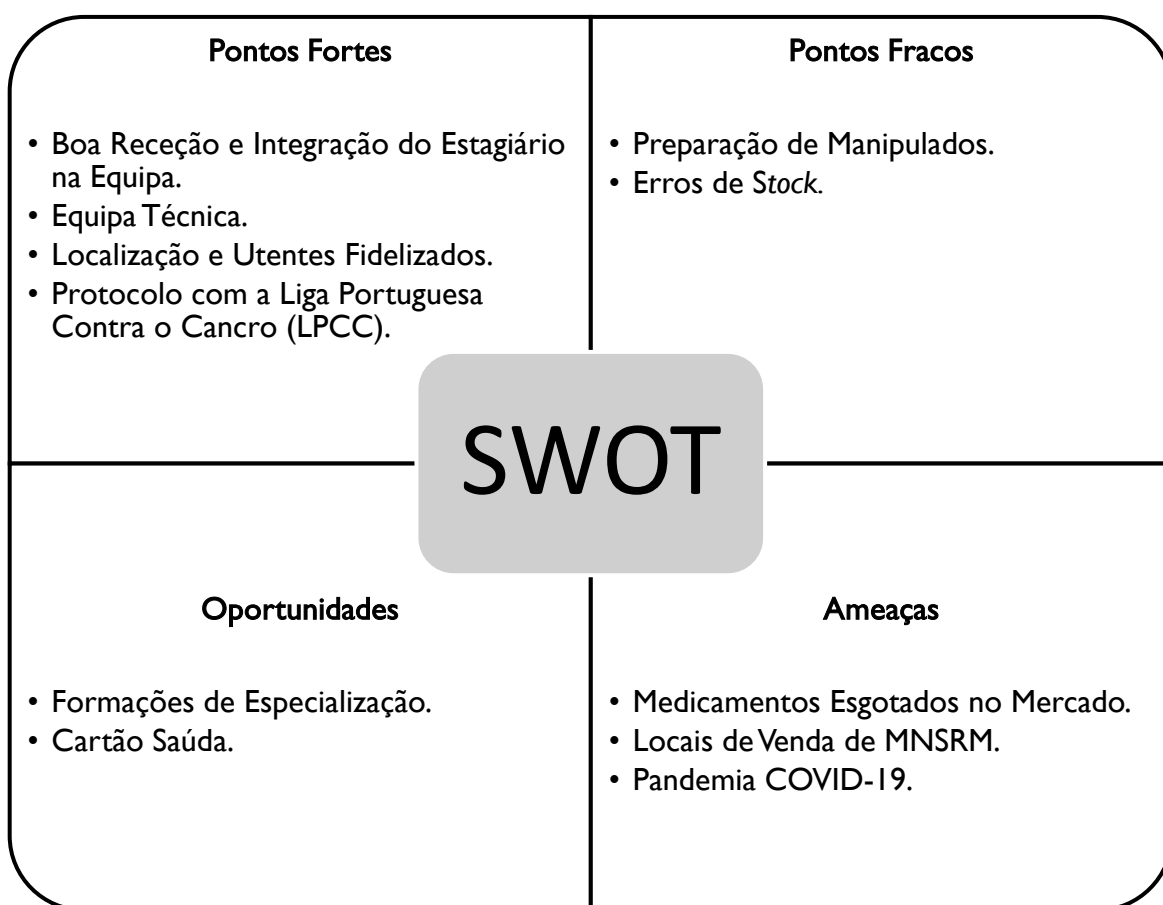
A situação pandémica que vivemos veio reforçar o papel fundamental que a FC desempenha em prol da comunidade. A prestação de serviços para a prevenção e proteção contra a propagação da COVID-19 através, quer da realização de testes, quer do aconselhamento farmacêutico tem sido crucial. Para além destes serviços, mais evidenciados recentemente, serviços como a promoção da literacia em saúde, a gestão do acompanhamento farmacêutico dos seus utentes, a determinação de parâmetros bioquímicos (e.g. medição da tensão arterial e da glicémia), a identificação de grupos de risco, a difusão de estilos de vida saudáveis (através de medidas não farmacológicas) e rastreios de doenças cardiovasculares (como a diabetes e a hipertensão arterial), da capacidade auditiva, da intolerância à lactose, etc., representam serviços de saúde essenciais para a comunidade.

Por forma a concluir o MICF, o plano curricular contempla a Unidade Curricular (UC) “Estágio” no último ano, onde a FC constitui parte obrigatória do mesmo (conforme a Diretiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 20 de novembro de 2013 (Artigo 44º, n.º 2)¹). O estágio em FC complementa a formação do estudante, ao colocá-lo num ambiente profissional que o desafia a aplicar toda a formação teórica e prática que adquiriu nos anos transatos, nomeadamente Farmacologia, Farmacoterapia, Farmácia Clínica e Indicação Terapêutica, essenciais para o bom desempenho de funções na FC.

Deste modo, tive a oportunidade de realizar o meu estágio na Farmácia Machado (FM), com uma duração de cerca de 4 meses, sob a orientação do Diretor Técnico e proprietário, Dr. João Maia. Nesta fase, coloquei em prática todos os conhecimentos resultantes de 5 anos de ensino teórico e prático, cumprindo um plano de estágio onde se encontram atividades como a gestão de *stocks*, receção e realização de encomendas, manutenção de receituário, organização e armazenamento dos medicamentos e, por fim, atendimento ao balcão.

No seguimento deste relatório é apresentada a minha análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*), relativa ao estágio realizado na FM.

2. Análise SWOT



2.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

2.1.1. Boa Receção e Integração do Estagiário na Equipa

Assim que iniciei o meu estágio na FM, a disponibilidade e espírito de ajuda por parte de qualquer colaborador da farmácia foram essenciais para a boa receção e integração na equipa, determinantes no sucesso de qualquer estagiário. Para além de uma ótima relação interpessoal que rapidamente se estabeleceu, senti-me sempre acompanhado em tudo o que fazia, onde qualquer dúvida que surgisse, o esclarecimento era imediato.

O início do estágio foi marcado por aprender todo o ciclo do medicamento dentro da farmácia. Assim que as encomendas chegam à mesma, é feita a sua receção no *software* Sifarma2000® (indispensável para o funcionamento de qualquer farmácia), conferida a sua validade e integridade, confirmação dos valores nas faturas que acompanham as encomendas e, por fim, armazenamento dos medicamentos no local estipulado. Nas primeiras semanas, as tarefas designadas eram essencialmente tarefas de *back office*, o que permitiu sedimentar todo

o conhecimento acerca dos atalhos e acessos do Sifarma2000[®]. Isto permitiu, também, que realizasse as tarefas com maior fluidez, tornando-as menos morosas, dispondo-me prontamente para qualquer outra atividade. Posteriormente, durante os “tempos mortos” tive oportunidade de observar e ajudar qualquer colaborador da farmácia enquanto se processava o atendimento ao cliente (e.g. buscar os medicamentos que o utente requeria). Assim, foi possível perceber o *modus operandi* de cada processo (e.g. se o utente procurava um MNSRM ou se trazia receita) e de cada colaborador da farmácia, o que mais tarde tornou o processo de atendimento ao utente muitos mais fácil e fluído.

Para além disso, a confiança depositada foi crucial para me sentir à vontade na realização de tarefas, o que rapidamente me tornou autónomo, sempre com a devida supervisão.

2.1.2. Equipa Técnica

A equipa técnica da FM é composta pelo Dr. João Maia, Diretor Técnico, pela Dra. Mariana Lopes, Dra. Rita Garret e pelo Dr. João Teixeira, farmacêuticos, e pelo Sr. Eduardo Cruz, técnico de farmácia. Caracterizada pela diversidade, conjugando o conhecimento proveniente da experiência e profissionalismo com o dinamismo, a equipa consegue transmitir uma imagem de credibilidade e segurança aos seus utentes.

O bom ambiente que se faz sentir no espaço da Farmácia, aliado ao espírito de equipa e entreadajuda, estimula o estagiário mantendo-o motivado na realização das tarefas. Sempre atenta e preparada para os desafios que surgem no dia-a-dia, a equipa mostra uma capacidade de adaptação notável, bem como um enorme dinamismo que anula qualquer monotonia, por vezes associada ao trabalho em FC.

Considerando tudo o que foi dito anteriormente, torna-se fácil a integração na equipa, colocando o estagiário confortável e confiante na realização de tarefas na farmácia, aplicando regularmente todos os conhecimentos adquiridos durante o estágio, promovendo uma rápida autonomia no estagiário.

2.1.3. Localização e Utentes Fidelizados

A FM, situada em Celas, freguesia de Santo António dos Olivais, privilegiando de uma localização em pleno centro de Coimbra. A esta localização associa-se uma diversidade de utentes dada a sua proximidade a vários estabelecimentos comerciais e instituições de ensino, e, principalmente, a unidades de saúde como a Unidade de Saúde Familiar da Cruz de Celas (Centro de Saúde de Celas), o Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, a Maternidade Bissaya Barreto, o Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil (IPOCFG), entre outros.

Fundada em 1917, a FM possui um vasto grupo de utentes fidelizados, dada a confiança nos profissionais de saúde que os acompanham desde sempre. Inicialmente, o contacto com muitos dos utentes fidelizados (maioritariamente idosos ou familiares de idosos) era dificultado por ser a primeira vez que eram atendidos por um colaborador novo e jovem. No entanto, uma vez que estes utentes se deslocam regularmente à FM, por considerarem o seu local de eleição, torna-se relativamente fácil estabelecer uma ligação com o utente. A fidelização é de extrema importância, pois a certa altura já se é capaz de reconhecer muitos dos utentes, tornando a interação e posteriores atendimento e aconselhamento mais fáceis e mais personalizados, satisfazendo o utente.

2.1.4. Protocolo com a Liga Portuguesa Contra o Cancro (LPCC)

Tendo em conta a proximidade ao IPOCFG, a FM celebra um protocolo com a LPCC que visa assegurar que os doentes oncológicos com maiores dificuldades económicas tenham acesso aos medicamentos e/ou dispositivos médicos, bem como tratamentos complementares que necessitem. O protocolo surge como um auxílio financeiro, permitindo a dispensa dos medicamentos que o doente necessita, onde a LPCC suporta, parcial ou integralmente, a despesa dos mesmos.

O protocolo processa-se quando um utente se dirige à farmácia, fazendo-se acompanhar da Receita Eletrónica fornecida pelo médico do IPOCFG, bem como do documento emitido pela LPCC (reconhecido pela assistente social responsável). Neste documento consta a informação do doente, das prescrições eletrónicas que compreende, bem como os medicamentos a dispensar, e a quantidade dos mesmos ou a duração que devem compreender (geralmente sob a forma de uma frase – e.g. “Solicita-se a dispensa total da

receita”, “Solicita-se a dispensa de 3 embalagens” ou “Solicita-se a dispensa de medicação para 3 meses de tratamento”). Caso o doente não possua a documentação toda consigo, facilmente se contacta a assistente social responsável e rapidamente se obtém a documentação em falta. O crédito correspondente à dispensa dos medicamento é posteriormente regularizado pela Liga, no final do mês.

A meu ver, este protocolo constitui um dos pontos mais fortes do estágio devido ao constante contacto com doentes oncológicos, com quadros terapêuticos específicos necessitando, em muitos casos, de acompanhamento e aconselhamento terapêutico. Uma vez que se tratam de tratamentos prolongados, os utentes dirigiam-se à FM regularmente, permitindo um acompanhamento da terapêutica mais aprofundado, o que facilitava o esclarecimento de qualquer dúvida em relação ao tratamento. Para além disso, pude entender a realidade de todo o tratamento que um doente oncológico vive, nomeadamente as necessidades e dificuldades, incentivando-me a procurar o melhor acompanhamento possível.

2.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

2.2.1. Preparação de Manipulados

A preparação de medicamentos (e.g. pomadas, cremes, xaropes, etc.) é a atividade que sempre foi reconhecida ao farmacêutico. No entanto, tendo em conta os avanços tecnológicos da Indústria Farmacêutica, esta atividade caiu em desuso dado o aparecimento de produtos capazes de responder às necessidades sem exigir manipulação prévia.

Apesar de o plano curricular do MICE na FFUC contemplar a UC “Farmácia Galénica”, que prepara o estudante para a preparação de vários manipulados, não tive a oportunidade de experienciar ou observar a preparação destes durante o meu período de estágio.

2.2.2. Erros de *Stock*

O Sifarma2000[®], enquanto sistema informático da maioria das farmácias portuguesas, é responsável por grande parte dos processos de gestão relativos à farmácia, como a faturação, receção de encomendas, dispensa de medicamentos, gestão de *stocks* e de prazos de validade, etc. Assim, o acerto de *stocks* é realizado através deste *software*, em tempo real, à medida que se rececionam encomendas e se dispensam medicamentos ou produtos.

Contudo, deparei-me, em alguns dos atendimentos, que os *stocks* que o sistema informático apresentava não correspondiam à realidade, em que, ou apresentava quantidades de medicamentos acima das existentes ou indicava que existiam medicamentos em *stock*, quando na realidade estavam em falta, causando transtornos ao utente aquando da comunicação durante o atendimento. Esta discrepância entre o que era informado pelo Sifarma2000® e o que se observava na realidade poderá ter como causa erros de *stock* ou no arrumo dos medicamentos no local pressuposto.

Por forma a resolver este problema, o *modus operandi* consistia em realizar uma encomenda instantânea a um dos distribuidores, com os quais a FM tem maior proximidade (como a Plural+Udifar ou a Empifarma), tentando assegurar a obtenção do medicamento, que o utente necessitava, num curto espaço de tempo. No entanto, por vezes a situação causava transtorno ao utente, uma vez que a celeridade deste processo dependia da hora do dia a que era realizada a encomenda. Na maioria dos casos, o utente necessitava do medicamento com urgência, tendo de se deslocar a outra farmácia para obter o medicamento.

2.3. Oportunidades (*Opportunities*)

2.3.1. Formações de Especialização

A equipa da FM, caracterizada pelo seu dinamismo, profissionalismo e vontade em estar constantemente atualizada de forma a responder às necessidades dos seus utentes, incentiva os seus estagiários a assistir a formações com o intuito de melhorarem os seus conhecimentos no seio da FC e, conseqüentemente, o seu aconselhamento farmacêutico.

Como tal, tive a oportunidade de assistir a formações no âmbito da dermofarmácia e cosmética através da plataforma Academia Cosmética Ativa, melhorando as minhas capacidades de aconselhamento relativamente a determinados produtos cosméticos.

2.3.2. Cartão Saúde

Comumente conhecido como cartão das Farmácias Portuguesas, o Cartão Saúde é um serviço que apenas as farmácias que integram as Farmácias Portuguesas possuem. Este cartão permite aos utentes acumularem pontos à medida que compram produtos na farmácia, sendo que os produtos de venda livre, nomeadamente Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

(MNSRM) ou produtos de saúde (e.g. produtos de cosmética), convertem por cada euro gasto, 1 ponto. Assim, à medida que o utente acumula pontos, pode rebatê-los quer em produtos, serviços, MNSRM (que estejam contemplados no Catálogo de Pontos Saúde) ou como valor monetário.

Este cartão representa, assim, uma mais-valia ao utente, uma vez que lhe permite poupar em produtos ou medicamentos, muitas vezes indispensáveis para a sua saúde. Para além disso, durante o estágio deparei-me com muitos utentes que desconheciam a existência do cartão, o que representou uma oportunidade para fidelizar o utente, uma vez que o mesmo passa a aderir a um serviço que o ajuda monetariamente, havendo uma maior probabilidade de que retorne à farmácia que o informou acerca de um serviço que o beneficia.

2.4. Ameaças (*Threats*)

2.4.1. Medicamentos Esgotados no Mercado

A falta de medicamentos é uma realidade que a Farmácia Comunitária experiencia todos os dias. Durante o meu estágio deparei-me com vários utentes a solicitar um determinado medicamento, dado que nenhuma das farmácias que tinham visitado anteriormente, o tinha. Este problema deve-se, principalmente, à interrupção da produção desse fármaco por parte das indústrias farmacêuticas ou à exportação paralela do mesmo para países estrangeiros onde os preços são mais atrativos, representando um maior retorno económico para os distribuidores.

Tal representa uma ameaça à saúde pública quando há falta de medicamentos para doenças crónicas como hipertensão, diabetes, DPOC, etc. Adicionalmente, o utente nem sempre reage bem e, por desconhecer a realidade da indústria farmacêutica, culpabiliza a farmácia pela falta do medicamento, muitas vezes descarregando a sua frustração em quem lhe transmite essa mesma informação, o farmacêutico.

2.4.2. Locais de Venda de MNSRM

O aumento de locais de venda de MNSRM tem pressionado a FC a reinventar-se a nível comercial, desenvolvendo estratégias de marketing e técnicas de venda mais estruturadas por forma a combater a perda de terreno no campo dos MNSRM e *Consumer Healthcare*.

Tendo em conta que os produtos de venda livre, como os MNSRM e os produtos de saúde (e.g. produtos cosméticos), representam uma grande parte das receitas em FC, o aumento de locais de venda de MNSRM aliado aos preços mais competitivos que estes detêm, constituem uma grande ameaça à FC. Apesar da FC providenciar um aconselhamento farmacêutico altamente personalizado, este é muitas vezes desvalorizado como consequência da globalização digital, em que os *influencers* (pessoas que promovem determinadas marcas ou produtos, usando a sua influência no vasto público que as segue), muitas vezes, transmitem informações erradas ao utente que, em alguns casos, considera essa informação como correta e a do farmacêutico como errada. Como tal, a FC tem invadido as plataformas digitais por forma a combater desinformação, que nestes tempos de pandemia se observou ainda mais.

2.4.3. Pandemia COVID-19

O início do meu estágio em FC coincidiu com a altura em que a pandemia COVID-19 agravou significativamente em Portugal, influenciando bastante o meu estágio.

A utilização de acrílicos nos balcões de atendimento, o uso constante de máscara bem como o distanciamento ao balcão, embora eficazes na prevenção e proteção contra a COVID-19, prejudicaram, em parte, o atendimento ao utente, dificultando a comunicação com o mesmo. Adicionalmente, o facto de vivermos em tempos de pandemia, as pessoas sentem-se desconfortáveis ao estarem demasiado tempo, num espaço fechado, querendo sair o mais depressa possível o que, aliado à difícil comunicação, pode levar a más compreensões e/ou interpretações do aconselhamento farmacêutico fornecido.

3. Casos Práticos

3.1. Contraceção Oral de Emergência (COE)

Utente do sexo feminino, na faixa etária compreendida entre os 20 e os 30 anos, desloca-se à farmácia com o seu parceiro, solicitando uma pílula do dia seguinte por ter tido uma relação sexual não protegida. Uma vez que se trata de um método farmacológico para evitar a gravidez indesejada, comecei por avaliar a situação através de algumas questões de forma a compreender se a COE seria uma opção segura e eficaz.

Iniciei por questionar a utente se estaria confortável em responder a algumas questões, de cariz mais pessoal, ao balcão ou se preferia que a conversa fosse tida no escritório – ambiente mais reservado por forma a evitar constrangimentos. Uma vez que naquele momento não se encontravam pessoas na farmácia, a utente mostrou-se recetiva, pelo que questionei se a relação tinha acontecido num período inferior a 120 horas, ao qual respondeu que tinha sido há mais de 3 dias (72h).

Continuei questionando se a falha do método contraceutivo tinha sido devido a esquecimento da toma da pílula, preservativo usado incorretamente, deslocação do DIU (dispositivo intrauterino) ou se o anel vaginal tinha sido expulso antes do tempo. A utente informa que tomou a pílula no dia em que teve a relação sexual, método contraceutivo regular, mas sente-se receosa afirmando que experienciou emese cerca de 30 minutos depois da relação sexual, aproximadamente entre 2 a 3 horas após a toma da pílula. Para além disso, indica que não tinha o blister consigo e que ainda não retomou a toma da pílula, perfazendo 3 dias consecutivos de falhas na toma do método contraceutivo hormonal.

Concluindo que existiu esquecimento ou falha da toma de dois ou mais comprimidos, o comprometimento da eficácia da pílula é iminente, dependendo da semana do ciclo menstrual em que ocorram. Deste modo, questionei em que semana do ciclo menstrual a utente se encontrava, percebendo que se encontrava na segunda semana, entre o 1º e o 7º dia de toma da pílula.

Uma vez que se trata de um esquecimento da toma da pílula de dois ou mais comprimidos, nesta fase, comprometedor da eficácia do método contraceutivo hormonal e tendo ocorrido uma relação sexual não protegida durante esse mesmo período, e considerando a vontade da utente, indico a toma de acetato de Ulipristal 30 mg (ellaOne®) como COE. Como parte do aconselhamento farmacêutico, informo que a COE tem uma

eficácia tanto maior, quanto mais rapidamente for iniciado o tratamento e que a sua toma não substitui o uso regular de um método contraceptivo, pelo que deve retomar o seu método contraceptivo regular 5 dias após a toma da COE. Adicionalmente, caso ocorra emese durante as 3 horas após a toma, deve dirigir-se logo à farmácia para repetir a toma, reforçando que a COE constitui uma alternativa em casos necessários e não como método contraceptivo².

Informo ainda que a COE não confere proteção contraceptiva para relações posteriores, pelo que após a sua toma deve utilizar um método de barreira fiável até ao início da menstruação seguinte. Esclareço ainda que a menstruação pode ocorrer alguns dias antes ou depois do esperado e que caso a menstruação esteja com um atraso superior a 5 a 7 dias, deve realizar um teste de gravidez.

Por fim, despeço-me informando que pode contactar a farmácia através do contacto telefónico, que se encontra na fatura, ou visitando a farmácia para o esclarecimento de qualquer dúvida que surja.

3.2. *Cross-selling*

Utente do sexo masculino desloca-se à farmácia, solicitando Telfast 120[®] para o alívio sintomático da rinite alérgica sazonal, informando que é habitual sentir espirros, rinorreia e comichão no nariz nesta altura do ano. Após questionar, afirma não saber qual o motivo que poderá ser a causa do incómodo, mas que, normalmente, costuma sentir-se bem após a toma do medicamento.

Para além do MNSRM solicitado, recomendo a limpeza nasal diária com solução isotónica de água do mar, por forma a restringir o contacto das fossas nasais com os alergénios. Adicionalmente, recomendo também a realização do teste cutâneo para identificação do alergénio que está a provocar os sintomas.

3.3. *Uso Irracional de Antibióticos*

Utente do sexo feminino, na faixa etária entre os 30 e os 40 anos, desloca-se à farmácia suspeitando estar no início de uma infeção urinária (IU). Refere ainda que sente desconforto ao urinar, sintoma que já experienciara previamente quando fora diagnosticada com IU, procurando um antibiótico, uma vez que se tinha demonstrado eficaz na infeção anterior.

Como tal, questionei se a utente, para além do desconforto que afirmava sentir, sentia disúria ou se se tinha apercebido da presença de sangue na urina, pelo que respondeu negativamente, indicando apenas que sentia o desconforto anteriormente referido, nunca reparando se havia presença de sangue, e que queria levar o antibiótico de maneira a evitar as complicações mencionadas.

Tendo em conta a situação, expliquei à utente que estava impedido de dispensar qualquer antibiótico sem a existência de prescrição médica, uma vez que se trata de um MSRM, podendo apenas cedê-lo após diagnóstico de IU mediante consulta médica. A cedência de antibióticos sem critério pode originar resistências bacterianas aos mesmos, desencadeando situações severas.

Reforço novamente a utente acerca da importância do uso racional de antibióticos, bem como cumprir as indicações do médico relativamente à duração da toma e posologia, explicando a gravidade da criação de resistências bacterianas. Adicionalmente, recomendei um suplemento à base de arando vermelho americano (*Vaccinium macrocarpon*) – Cistisil® – cuja composição em proantocianidinas promove a inibição da aderência das bactérias responsáveis pela infeção às paredes do trato urinário, contribuindo para a prevenção de IUs. Recomendo ainda o aumento de ingestão de líquidos, cuidados gerais de higiene íntima regulares, tal como não adiar o ato de urinar³, reforçando que deverá consultar um médico caso a situação não melhore.

4. Considerações Finais

Findado o meu estágio em FC, compreendo a importância do farmacêutico comunitário na sociedade, enquanto agente de saúde pública na prestação de serviços de saúde de qualidade. Como primeira-linha de saúde à qual as pessoas recorrem quando têm sintomas, questões acerca dos seus tratamentos ou quando procuram uma solução para um determinado problema, o farmacêutico desempenha um papel fundamental na manutenção da saúde pública.

Como tal, o farmacêutico deve prezar, durante toda a sua carreira, pela constante atualização dos seus conhecimentos, bem como a aquisição de novos, estando responsável pelo estabelecimento de uma ponte entre o complexo mundo científico e a comunidade, prestando um aconselhamento e acompanhamento terapêutico de qualidade.

Na FM, tive a oportunidade de aprofundar os meus conhecimentos e compreender aquilo que a FC representa. Tal deveu-se, essencialmente, à equipa técnica que me acompanhou e contribuiu para que me tornasse autónomo nas diversas tarefas que realizei, restando agradecer por toda a disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas e, para além de momentos de aprendizagem, todos os momentos de companheirismo e amizade.

Apesar da situação pandémica que, de certa maneira, afetou o meu estágio, a diversidade de utentes com que lidei, os valores que a equipa da FM me incutiu, tanto no seio da FC como a nível pessoal, o contacto com doentes oncológicos, a valorização do bem-estar e saúde do utente em detrimento do interesse comercial e lucrativo, moldaram-me não só enquanto pessoa, mas como futuro farmacêutico.

Concluindo, o estágio na FM revelou-se uma experiência muito positiva e enriquecedora, na medida em que despertou o meu interesse por esta área profissional, dado o contributo que prestamos à comunidade, embora, por vezes, invisível aos olhos da mesma.

5. Bibliografia

1. PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - **Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0055&from=DA>
2. INFARMED I.P. - **Resumo das Características do Medicamento - ellaOne®**. [Consultado a 11 de outubro de 2021]. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/ellaone-epar-product-information_pt.pdf
3. **SILFARMAPLUS - Cistil®**. [Consultado a 11 de outubro de 2021]. Disponível em <https://silfarmaplus.pt/produto/cistisil/>

PARTE II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto da Bluepharma
Indústria Farmacêutica, S.A.

Sob orientação do Dr. Tobias Daniel Cruz Leite e Silva

Lista de Abreviaturas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

COVID-19 – *Coronavirus Disease 2019*

DCAT – *Drug, Chemical & Associated Technologies Association, Inc.*

EC – Estágio Curricular

EMA – *European Medicines Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

I&D – Investigação e Desenvolvimento

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*

UC – Universidade de Coimbra

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) fornece uma vasta gama de ferramentas e conhecimentos através do seu plano curricular, constituindo um dos cursos mais polivalentes da Universidade de Coimbra (UC). Permite, assim, enveredar por diversas áreas profissionais, como a Farmácia Comunitária, Farmácia Hospitalar e Indústria Farmacêutica.

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), através do Estágio Curricular (EC) contemplado no plano curricular permite que o estudante aprofunde e pratique os conhecimentos que adquiriu ao longo do MICF. Para além do estágio em Farmácia Comunitária (obrigatório), o EC providencia ao estudante a oportunidade de realizar estágio quer em Farmácia Hospitalar ou em Indústria Farmacêutica (de acordo com a Diretiva 2013/55/EU, do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013 (Artigo 44º, nº 2)¹). Ao longo do meu percurso académico, o MICF sempre suscitou o interesse em conhecer a Indústria Farmacêutica, o seu modo de funcionamento e como se processa todo o ciclo de vida do medicamento. Como tal, foi-me possível realizar estágio numa empresa farmacêutica – a Bluepharma (BLPH) – após uma entrevista disponibilizada aos alunos finalistas do MICF.

2. Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

2.1. Enquadramento na Bluepharma e Acolhimento, Apresentação Geral das Atividades e Responsabilidades do Departamento

2.1.1. Apresentação da Bluepharma

O Grupo Bluepharma é uma notável empresa portuguesa do setor farmacêutico quer pelo seu desempenho a nível empresarial quer pelas suas componentes inovadora e empreendedora, as quais permitiram à empresa conquistar um prestígio inquestionável a nível nacional, como também no exigente panorama internacional. Ao longo destes 20 anos de história, com exceção da síntese de substâncias ativas, a BLPH preocupou-se em alocar a sua atividade em toda a cadeia de valor do medicamento, desde I&D até ao mercado. Destaca-se, não só pela crescente procura de se exceler na sua unidade de produção, mas também pela melhoria contínua dos seus colaboradores (através de formações, por exemplo) e pela experiência e dinamismo da sua equipa de gestão^{2,3}.

Consequência do crescente desenvolvimento da BLPH, é de conhecimento público o investimento para os próximos 10 anos, num valor superior a 200 milhões de euros, impondo a sua posição de apostar cada vez mais na inovação e no desenvolvimento de medicamentos de valor acrescentado bem como na qualidade dos seus processos de fabrico e de comercialização, refletindo assim a missão da empresa. Este investimento permitirá um *boom* no setor da indústria farmacêutica e possibilitará a formação do maior *cluster* farmacêutico a nível nacional.

Os 20 anos da BLPH foram marcados por diversas conquistas como as certificações a nível ambiental (ISO 14001/1999), da qualidade (ISO 9001/2000), segurança e saúde ocupacional (OHSAS 18000) e recentemente em Investigação, Desenvolvimento e Inovação (IDI). A Bluepharma observou uma evolução de uma unidade industrial com 58 pessoas que operava no mercado nacional para um grupo farmacêutico que alberga 20 empresas e emprega mais de 700 colaboradores. Para começar a operar no mercado internacional obteve, em 2009, aprovação por parte da FDA, das autoridades reguladoras mais exigentes relativamente à qualidade e segurança do produto e por parte de outras autoridades reguladoras centrais como a EMA e a ANVISA, tendo a Bluepharma exportado mais de 88% da sua produção para mais de 40 países^{2, 4}.

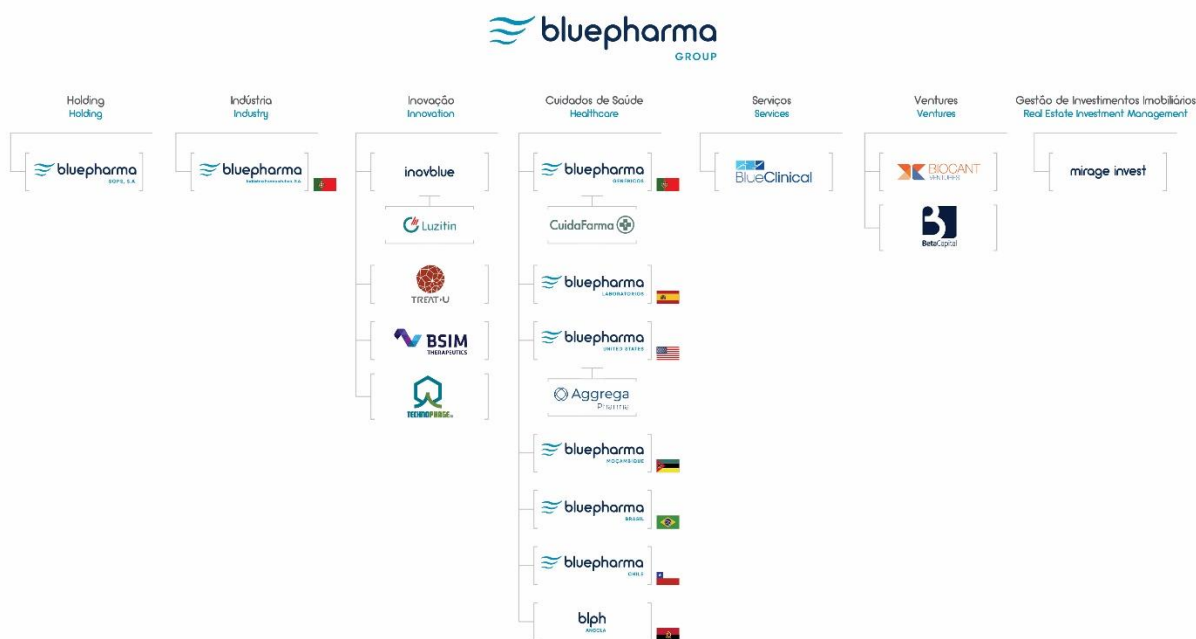


Figura I – Organigrama do Grupo Bluepharma (retirado de BLUEPHARMA - Grupo Bluepharma. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>).

2.1.2. Acolhimento

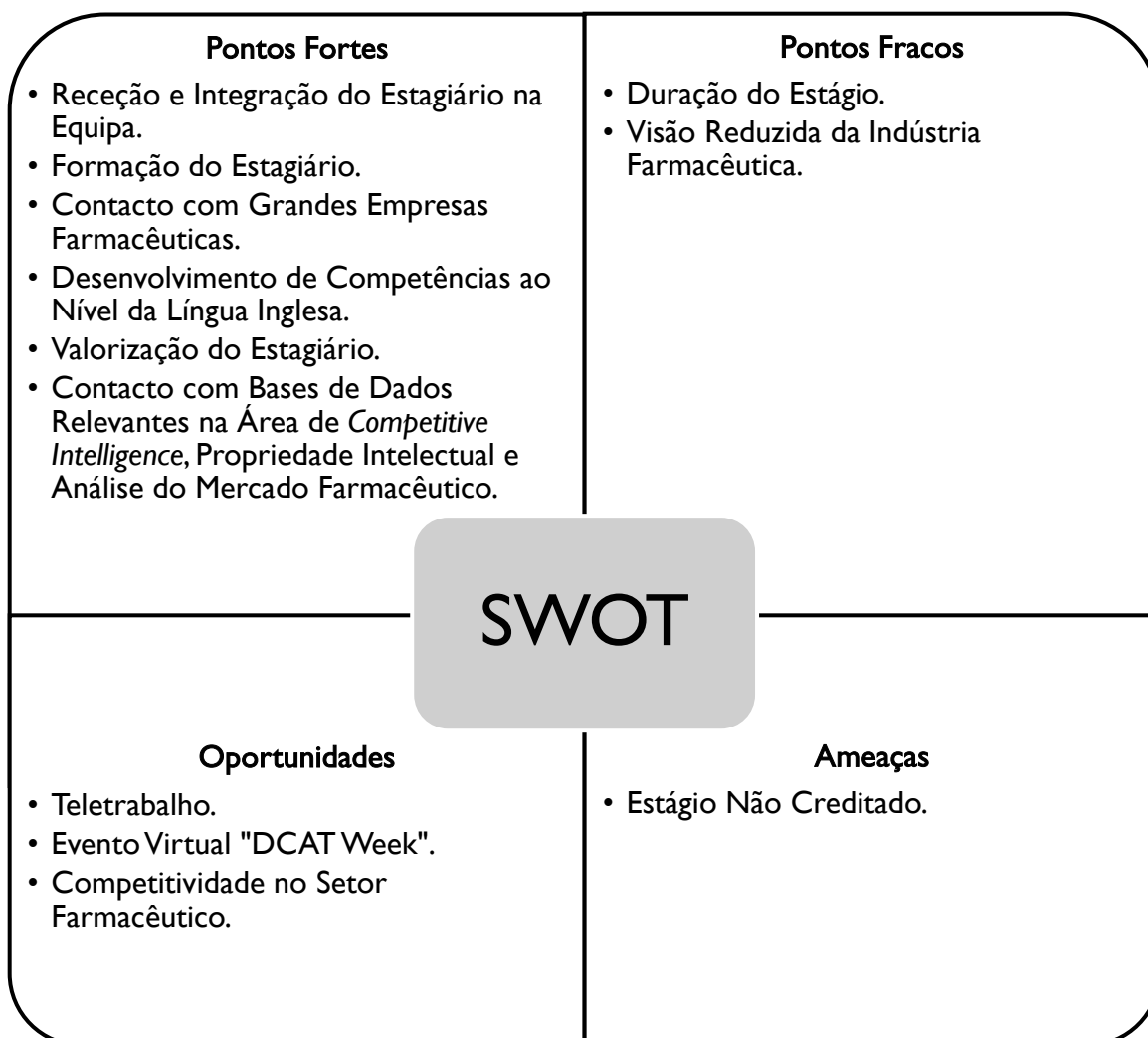
A sessão de acolhimento realizada no primeiro dia na BLPH, pelos Recursos Humanos, proporcionou uma integração na empresa imediata através de uma apresentação da mesma, desde o Conselho de Administração até aos mais variados departamentos e por uma breve descrição do funcionamento da empresa (refeições, horários, medidas de higiene, etc.). Após a sessão de acolhimento, foi-me apresentado o departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto e setor de Parcerias Estratégicas pelo Dr. Tobias Leite Silva, no qual iria exercer as atividades relativas ao meu estágio curricular em Indústria Farmacêutica.

Mais tarde foi realizada uma sessão de apresentação da empresa pelo Presidente Dr. Paulo Barradas Rebelo, iniciando-se com uma breve apresentação dos colaboradores presentes na sessão seguindo-se da apresentação da BLPH, contando como esta foi fundada, os desafios que surgiram ao longo dos anos e algumas estórias interessantes que moldaram a Bluepharma na grande empresa que hoje é.

2.1.3. Apresentação Geral do Departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto (Atividades e Responsabilidades)

Como supramencionado, o meu estágio foi realizado no departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto – setor de Parcerias Estratégicas, sob orientação do Dr. Tobias Silva, responsável pelo mesmo. Incide sobre o setor de Parcerias Estratégicas uma elevada importância, uma vez que é o responsável pelo estabelecimento de contacto com outras empresas do ramo farmacêutico relativamente a oportunidades de negócio para o território da América do Norte que a BLPH possui e averiguar todos os parâmetros a ter em conta para uma eventual parceria. O setor de Parcerias Estratégicas destaca-se também por analisar os diversos mercados (essencialmente o mercado de genéricos de formas sólidas), avaliar o desempenho de outras empresas para possíveis contactos e informar-se acerca de eventuais competidores no mercado alvo por forma a desenvolver uma estratégia de negócio que coloque a BLPH numa posição vantajosa em relação aos demais competidores (*Competitive Intelligence*). Dentro do setor incluem-se também atividades como análise de propriedade intelectual e de informação relevante de medicamentos inovadores de referência para desenvolvimento de medicamentos genéricos que ajudarão na construção de uma estratégia de gestão do desenvolvimento do medicamento bem como do seu ciclo de vida.

3. Análise SWOT



3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

3.1.1. Receção e Integração do Estagiário na Empresa

O estágio em Indústria Farmacêutica proporciona ao estudante experienciar a vida profissional, abandonando a sua zona de conforto o que pode dificultar a sua adaptação ao ambiente profissional. Como tal, considere fundamental a receção no meu primeiro dia de estágio pelo departamento de Recursos Humanos que explanou a organização estrutural e modo de funcionamento da empresa bem como os seus valores e objetivos. A receção e integração na BLPH no início do estágio proporcionaram uma fácil adaptação e foram cruciais para me sentir à vontade e motivado no desempenho de funções.

3.1.2. Formação do Estagiário

Realço o plano de formações que a BLPH providenciou como um dos maiores pontos fortes. Este plano é dedicado essencialmente aos novos colaboradores de qualquer departamento, transmitindo conhecimentos gerais acerca do modo de funcionamento da empresa e para um melhor e mais eficaz desempenho das suas funções bem como conhecimentos acerca de determinados *softwares* ou outras plataformas relevantes para a realização de tarefas.

Quando iniciei o estágio, fui informado acerca do plano de formações, no qual tinha que cumprir as formações de cariz geral durante o meu primeiro mês, tais como: “Enquadramento e Evolução Histórica da Bluepharma e Política de Recursos Humanos”, “Melhoria Contínua”, “Qualidade e GMP”, “SGI: Investigação, Desenvolvimento e Inovação”, entre outras. Tive também acesso a formações mais direcionadas para as atividades que iria desempenhar, ministradas pela equipa do departamento de Desenvolvimento do Negócio, por forma a aprender a trabalhar com *softwares* de análise de mercado farmacêutico, com bases de dados relevantes e a conhecer melhor a área do setor em que estava inserido. Estas últimas foram essenciais na minha integração ao tornarem-me mais autónomo e motivado na realização de tarefas, o que levou a que estas fossem menos morosas e concluídas dentro das *timelines*. Para além das formações, existem fóruns que possibilitam a discussão de ideias entre colaboradores, tornando assim a empresa mais dinâmica e enriquecedora.

3.1.3. Contacto com Grandes Empresas Farmacêuticas

Ao longo do estágio tive oportunidade de contactar com grandes empresas farmacêuticas como a TEVA, Apotex, entre outras, devido a este ter coincido com o evento global “DCAT Week” que decorre todos os anos onde diversas empresas farmacêuticas reúnem para apresentar as suas oportunidades de negócio. Caso haja interesse por parte da empresa à qual é apresentada uma oportunidade de negócio, dá-se então início a um processo em que ambas assinam um contrato de confidencialidade por forma a discutir em mais pormenor essa mesma oportunidade sem que haja comprometimento dos dados.

Como tal, tive a oportunidade de assistir às reuniões que o Dr. Tobias Leite Silva tinha com as variadas empresas, aprendendo como conduzir uma reunião e a apresentar as oportunidades de negócio por forma a suscitar o interesse no cliente. Para além disto, a equipa

do departamento em que estava inserido procedia a uma prévia reunião para analisar o cliente e perceber que oportunidades poderiam ser mais relevantes no decorrer da reunião, o que levou a que conhecesse em maior detalhe as variadas empresas e a perceber o seu modelo de negócio.

3.1.4. Desenvolvimento de Competências ao Nível da Língua Inglesa

Como referido anteriormente, a “DCAT Week” tornou o meu estágio mais desafiador uma vez que contactei várias empresas para agendar as reuniões bem como conversar com os diversos representantes das mesmas, maioritariamente *Business Development Managers* e/ou *Directors*. Como tal, todas estas reuniões foram realizadas através do uso da língua inglesa levando a que o meu inglês melhorasse substancialmente na medida em que aprendi diversos termos mais aplicados ao mundo farmacêutico e do negócio que não tinha conhecimento até então. Num mundo profissional em que o inglês se torna a língua universal, considero bastante positiva esta experiência durante o estágio, dado que o estudante não tem muitas oportunidades de aplicar a língua inglesa como parte do plano curricular, o que no caso de estudantes que não estejam devidamente acostumados à mesma ou que não a pratiquem regularmente pode dificultar a sua adaptação.

3.1.5. Valorização do Estagiário

Para além da receção na equipa, o *mentoring* do Dr. Tobias Leite Silva foi essencial na aprendizagem e prática de todos os conhecimentos no estágio tornando-me autónomo na realização das tarefas que me eram delegadas, o que fez com que me sentisse totalmente integrado na equipa. Durante todo o período de estágio senti um acompanhamento crucial que me auxiliou no desempenho de tarefas como: atualizar o portfolio da BLPH direcionado para o mercado dos Estados Unidos da América, atualizar *excels* onde se tratavam os dados provenientes do *software* de base de dados de mercado por forma a analisar os vários segmentos de mercado e mais especificamente o mercado de genéricos sólidos e a analisar possíveis competidores relativamente a uma subsidiária da BLPH. Ao longo do estágio deparei-me com diversos desafios, mas na fase final senti o meu trabalho valorizado e uma maior responsabilidade ao apresentar as oportunidades de negócio a um cliente o que elevou bastante toda a experiência pedagógica que tive enquanto estagiário.

3.1.6. Contacto com Bases de Dados Relevantes na Área de *Competitive Intelligence*, Propriedade Intelectual e Análise do Mercado Farmacêutico

Durante todo o período de estágio trabalhei essencialmente com um *software* de base de dados de mercado farmacêutico e com bases de dados de *Competitive Intelligence (Cortellis)*, de propriedade intelectual e de autoridades regulamentares (*Drugs@FDA*, *Orange Book (FDA)*, etc.). O conhecimento que adquiri ao explorar estas bases de dados despoletou em mim um maior interesse por esta área, percebendo como esta funciona e o impacto que tem dentro de uma empresa farmacêutica, para além de terem suportado todo o trabalho que desenvolvi durante o período de estágio.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Duração do Estágio

Segundo as Normas Orientadoras da Unidade Curricular “Estágio” do MICE, o estágio em Indústria Farmacêutica tem, obrigatoriamente, uma duração mínima de 280 horas, tendo depois os locais de estágio liberdade para definirem a duração de estágio consoante o estipulado. No caso da BLPH, a duração de estágio é de 3 meses, o que, apesar de exceder o mínimo de horas estipulado, acaba por ser insuficiente tendo em conta o trabalho que fui desenvolvendo. Por forma a ter uma experiência completa daquilo que é a Indústria Farmacêutica, mais especificamente no departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto, necessitaria de pelo menos 1 ano para acompanhar um processo de estabelecimento de parceria com outra empresa farmacêutica bem como todas as condições inerentes ao mesmo. Contudo, o período de estágio foi suficiente para me elucidar quanto ao modo de funcionamento do departamento em que estava inserido, embora não tenha conseguido aprofundar todos os conhecimentos que adquiri ao longo do mesmo.

3.2.2. Visão Reduzida da Indústria Farmacêutica

A BLPH possui diversos departamentos com funções únicas e complexas que se interligam entre si, transversais à maioria das restantes empresas farmacêuticas. No entanto, ao estagiar num único departamento não é possível ao estudante conhecer e perceber como funciona a Indústria Farmacêutica no seu todo, limitando a sua visão ao departamento em que

está inserido. Dada a duração de estágio, uma vez que se torna difícil completar as tarefas mais complexas e que, naturalmente, requerem mais tempo para a sua finalização, seria mais vantajoso haver rotatividade entre departamentos por forma ao estudante conhecer os diversos setores da Indústria Farmacêutica e obter uma visão abrangente do que esta representa e das diversas tarefas que são realizadas em cada departamento para atingir os objetivos da empresa. Embora sob o prejuízo de não ter oportunidade de aprofundar as ferramentas que adquire realizando o estágio seguindo os moldes acima referidos, este teria uma ideia da área que lhe suscitaria mais interesse para utilizar o seu estágio profissional.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Teletrabalho

Dada a situação pandémica causada pela COVID-19, o meu estágio foi maioritariamente realizado sob o regime de teletrabalho. Embora em Portugal se tenha instituído este regime como uma medida de prevenção e proteção contra a COVID-19, o teletrabalho já era uma realidade em muitos dos países com uma visão acerca do regime de trabalho e produtividade muito além de Portugal.

Ultimamente, as entidades empregadoras têm vindo a perceber que o teletrabalho aumenta a produtividade dos seus colaboradores bem como diminui a sua rotatividade, mantendo os colaboradores mais motivados, mais produtivos e acima de tudo mais satisfeitos, uma vez que permite ao trabalhador gerir melhor o seu tempo evitando “tempos mortos”. Para além disso, traz vantagens para a entidade empregadora, uma vez que permite, também, uma melhor gestão dos recursos humanos, evitando a sobrelotação das suas instalações.

Considero, então, que o teletrabalho se revelou uma oportunidade bastante enriquecedora que exigiu de mim uma melhor gestão de tempo, mantendo-me focado durante a realização das tarefas que me eram delegadas, para além de ter acelerado todo o processo de autonomia dentro da equipa, evitando “tempos mortos” resultado da dependência inicial para conseguir realizar as tarefas.

3.3.2. Evento Virtual “DCAT Week”

O facto de o meu estágio ter coincido com a realização do evento virtual “DCAT Week” constituiu uma das grandes oportunidades do meu estágio, elevando, assim, a minha experiência além do que estava à espera. A “DCAT Week” é um evento que se realiza todos os anos, no qual diversas empresas farmacêuticas se reúnem por forma a apresentarem as suas oportunidades de negócio aos seus clientes (outras empresas farmacêuticas). O principal intuito das empresas participantes é explorar oportunidade de colaboração para o desenvolvimento, fabrico e comercialização de medicamentos no mercado. Através da discussão de ideias, as empresas definem uma estratégia de negócio que beneficie ambas, bem como estabelecem condições contratuais entre as duas. A “DCAT Week” realiza-se, normalmente, num espaço físico com a presença das empresas havendo um encontro presencial entre os representantes das mesmas. Devido à situação pandémica em que vivemos, este evento realizou-se através de uma plataforma virtual. No caso da BLPH, esta não participou diretamente no evento, mas aproveitou a realização do mesmo para convidar empresas farmacêuticas para reunir virtualmente sob o mote desse mesmo evento.

Como tal, estive responsável pelo convite e posterior agendamento das reuniões com as diversas empresas que aceitaram o convite. Como já referido na secção **Pontos Fortes**, tive a oportunidade de assistir às reuniões conduzidas pelo Dr. Tobias Leite Silva, anotando o que era dito de relevante bem como aprendendo a conduzir uma reunião que no meu último dia de estágio se revelou de extrema importância ao ter que conduzir uma reunião e apresentar as oportunidades de negócio da BLPH. De referir que toda comunicação foi efetuada em inglês o que tornou ainda mais desafiadora esta experiência.

Posto isto, a coincidência do estágio com a “DCAT Week” foi extremamente pedagógica, preparando-me para o mundo profissional e para os desafios que este acarreta.

3.3.3. Competitividade no Setor Farmacêutico

O mundo farmacêutico é extremamente dinâmico dada a competitividade entre as várias empresas para o lançamento de medicamentos no mercado. Esta competitividade acentua-se particularmente no mundo dos medicamentos genéricos uma vez que as empresas farmacêuticas especializadas nos mesmos estão altamente atentas aos medicamentos

inovadores que entram no mercado, mas essencialmente na queda das patentes destes que permitem a entrada dos genéricos.

Assim, a competitividade representa uma oportunidade no estágio uma vez que dinamiza toda a experiência, havendo diversidade nas tarefas que são realizadas e desafiando o estagiário a pensar “fora da caixa”. Para além disso, a diversidade nas tarefas torna o estágio o menos monótono possível motivando o estagiário e mantendo-o concentrado no dia-a-dia.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Estágio Não Creditado

Face ao Artigo 44.º, Secção 7, Capítulo III da Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, “o título de formação de farmacêutico sanciona uma formação de, pelo menos, cinco anos,” nos quais se devem contemplar, no mínimo, “quatro anos de formação teórica e prática a tempo inteiro, ministrado numa universidade, num instituto superior de nível reconhecido como equivalente ou sob a orientação de uma universidade”, que durante ou no fim da formação teórica e prática, contempla seis meses de estágio em Farmácia Comunitária ou num Hospital⁵.

Considerando o acima descrito, o facto do estágio em Indústria Farmacêutica não ser creditado constitui uma ameaça ao mesmo. O estudante que decida englobar Indústria Farmacêutica no seu EC, para além de Farmácia Comunitária (obrigatório), tem de realizar um número total de horas superior ao estudante que estagie apenas em Farmácia Comunitária ou em Farmácia Comunitária e Hospitalar. Apesar de referir que a duração em Indústria Farmacêutica é curta tendo em conta a tipologia de tarefas que são realizadas, considero que a experiência supera esta ameaça. Não obstante a isso, o facto de o estágio em Indústria Farmacêutica não estar englobado na lei para efeitos de creditação demonstra uma desvalorização deste setor na formação do futuro Mestre em Ciências Farmacêuticas, com a certeza de que a lei se encontra totalmente desajustada e deve ser retificada num futuro próximo.

4. Considerações Finais

A oportunidade de estagiar numa Indústria Farmacêutica como a Bluepharma, *i.e.*, uma empresa que tem obtido continuamente resultados muito positivos e que se encontra a crescer de forma notável dentro do mercado farmacêutico, com o seu *core business* no mercado de genéricos, foi para mim, indubitavelmente, uma experiência extremamente enriquecedora.

Tendo em conta tudo o que referi ao longo do presente relatório, considero que englobar a Indústria Farmacêutica na Unidade Curricular “Estágio” prepara o estudante, enquanto farmacêutico, para o mundo profissional, proporcionando-lhe a oportunidade de vivenciar o que este representa. O MICEF prepara o estudante para as diversas saídas profissionais possíveis, dado o seu abrangente conteúdo programático. No entanto, esta abrangência acaba por limitar o estudante, na medida em que não detalha determinadas áreas. Neste seguimento, o EC torna-se crucial para que o mesmo tenha a oportunidade de escolher a área onde quer aprofundar os seus conhecimentos e, acima de tudo, adquirir novas ferramentas que o coloquem numa posição vantajosa face à competitividade que o mercado de trabalho apresenta.

Integrar o departamento de Parcerias Estratégicas e Desenvolvimento do Produto revelou-se desafiador e alargou a minha visão relativamente à Indústria Farmacêutica e ao vasto mundo que este setor engloba. Inicialmente, o meu foco virava-se para a Investigação e Desenvolvimento, no entanto, contactar com este setor mais direccionado para o Desenvolvimento do Negócio clarificou o caminho que desejo seguir enquanto futuro farmacêutico. Revelou-se um setor com tarefas desafiadoras, extremamente atento ao que de novo chega ao mercado farmacêutico, requerendo que o farmacêutico esteja constantemente atualizado. Para além disso, ao estagiar neste departamento, tive a oportunidade de contactar diretamente com diversas empresas farmacêuticas, das mais reconhecidas até às mais pequenas. Este contacto permitiu-me, ainda, melhorar as minhas capacidades de comunicação num contexto profissional.

Na certeza de que saio preparado para o mundo profissional, resta-me agradecer toda a disponibilidade e atenção prestadas pelo Dr. Tobias Leite Silva, essenciais para a minha aprendizagem, bem como todos os conhecimentos transmitidos para que me tornasse autónomo dentro da equipa, sem que o teletrabalho constituísse uma barreira ao meu acompanhamento.

5. Bibliografia

1. PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - **Diretiva 2013/55/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de novembro de 2013**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0055&from=DA>
2. BLUEPHARMA - **Grupo Bluepharma**. [Consultado a 4 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-bluepharmagroup.php>
3. BLUEPHARMA - **Quem somos**. [Consultado a 4 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about.php>
4. BLUEPHARMA - **História**. [Consultado a 4 de outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.bluepharma.pt/about-history.php>
5. PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA - **Diretiva 2013/36/UE do Parlamento Europeu e do Conselho de 26 de junho de 2013**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0036>

PARTE III

Monografia

Microfluidics: A Novel Method for Large-Scale Manufacturing of Liposome-Based Vaccines

Sob orientação da Professor Doutor Luís Maria Marques dos Santos Bimbo

Abstract

Liposomes have proved to be a top choice for drug delivery systems due to its distinct biocompatibility and biodegradability. Also, liposomes offer a strong adjuvant platform improving vaccine efficacy and stability. Microfluidic-based technologies have risen as a new method capable of tackling the limitations of macroscale methods beside the ability to be easily scalable. In this paper, I seek to provide an analysis over a promising liposomal adjuvant and liposome physicochemical properties that impact its biological activity as well as a critical comparison between microfluidic technologies and its bulk counterparts with focus on microfluidic hydrodynamic focusing (MHF) methods. Furthermore, a brief insight on microfluidic architectures for mass production of liposomes is provided.

Keywords: liposomes; cationic liposomes; drug delivery systems; microfluidics; microfluidic devices; subunit vaccine.

Resumo

Os lipossomas têm demonstrado ser uma escolha popular como sistemas de entrega de fármacos devido à sua distinta biocompatibilidade e biodegradabilidade. Os lipossomas oferecem também uma adequada plataforma adjuvante que melhora a eficácia e estabilidade da vacina. As tecnologias microfluídicas surgiram como um novo método capaz de enfrentar as limitações dos métodos macroscópicos, para além da capacidade de serem facilmente escalonáveis. Neste artigo, procuro fornecer uma análise sobre um promissor sistema adjuvante lipossomal e as propriedades físico-químicas dos lipossomas que têm impacto na sua atividade biológica, bem como uma comparação crítica entre as tecnologias microfluídicas e as suas contrapartes a larga escala com foco nos métodos microfluídicos de focalização hidrodinâmica (MHF). Além disso, é fornecida uma breve visão sobre arquiteturas microfluídicas para a produção em massa de lipossomas.

Palavras-chave: lipossomas; lipossomas catiónicos; sistemas de entrega de fármacos; microfluídica; dispositivos microfluídicos; vacinas de subunidade.

Abbreviations

μMi-REM – Micromilling-Replica Moulding

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

APC – Antigen Presenting Cell

CAF – Cationic Adjuvant Formulation

CQA – Critical Quality Attributes

DC-Chol – 3β-[N(N',N'-dimethylaminoethane)carbonyl]cholesterol

DDA – Dioctadecyldimethylammonium Bromide

DMPG – 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)

DMSO - Dimethyl sulfoxide

DOPC – 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

DOPE – 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine

DOTAP – 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane

DOTMA – 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propane

DSPC:Chol – 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

FDA – Food and Drug Administration

FRR – Flow Rate Ratio

GMP – Good Manufacturing Practice

GUV – Giant Unilamellar Vesicles

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

i.m. – Intramuscular

i.p. – Intraperitoneal

IPA – Isopropanol

LET – Liposome Encapsulation Technology

LNP – Lipid Nanoparticle

LUV – Large Unilamellar Vesicles

MHF – Microfluidic Hydrodynamic Focusing

MLV – Multilamellar Vesicles

MMG – Monomycoloyl glycerol analogue I

MNPS – Mononuclear Phagocytic System

mRNA – Messenger Ribonucleic Acid

PDI – Polydispersity Index

PDMS – Polydimethylsiloxane

pDNA/CL – plasmid DNA/cationic liposome

PEEK – Polyetheretherketone

Poly(I:C) – Polyinosinic:polycytidylic acid

PS – L- α -phosphatidylserine

QbD – Quality by Design

SUV – Small Unilamellar Vesicles

TFR – Total Flow Rate

I. Introduction

“Liposomes” are spherical vesicles consisting of one or more phospholipid bilayers or lamellae with an internal cavity containing a small volume of aqueous liquid. Besides its phospholipid bilayer, liposome structural components can be synthetic amphiphiles incorporated with sterols, usually cholesterol, in order to alter membrane permeability. Liposomes are most usually classified based on their size (small, large and giant vesicles), the number of bilayers (uni-, oligo- and multi-lamellar), the phospholipid charge (neutral, cationic or anionic), the morphology, the degree of homogeneity and the lipid composition^{1,2}. According to *Sharma A. and Sharma U.* we can classify liposomes based on their size and number of bilayers as small unilamellar vesicles (SUV), large unilamellar vesicles (LUV), giant unilamellar vesicles (GUV) and multilamellar vesicles (MLV)³ (Figure 1). Recently, it is possible to categorize liposomes according to their function as conventional, ligand-targeted, PEGylated or multifunctional liposomes². These vesicles have become popular for biomedical and biotechnological purposes due to their biocompatibility, biodegradability and their ability to enhance therapeutic effect of various agents by altering their pharmacokinetics and pharmacodynamics^{4,5}. Depending on the preparation protocol and its final use, their dimensions can vary but as they are widely employed for medical use, they are usually unilamellar with a desirable size ranging between 50 and 200 nm, which depends on the molecule we pretend to encapsulate, its administration route and its target⁴.

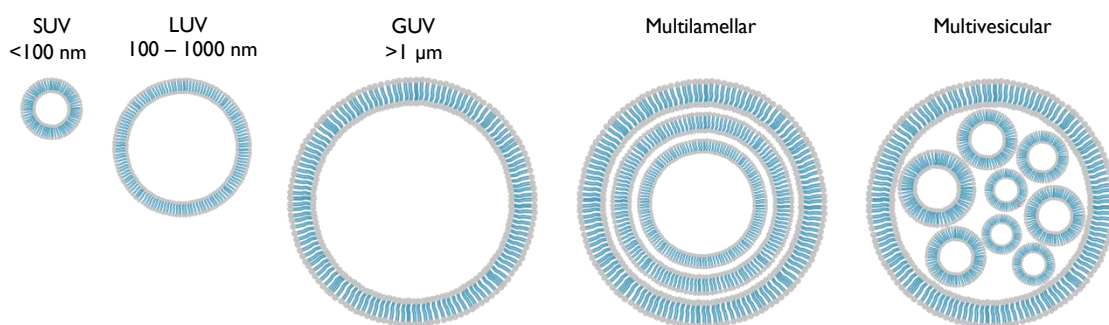


Figure 1. Classification of liposomes according to their size and number of bilayers. Multivesicular vesicles have smaller vesicles encapsulated. (Adapted from: SWAAY, Dirk VAN; DEMELLO, Andrew - Microfluidic methods for forming liposomes. Lab on a Chip. ISSN 14730189. 13:5 (2013) 752–767.)⁶

Liposomes were first discovered by Alec D. Bangham in the 1960s at the University of Cambridge and were at the time named Banghasomes⁷. Since then, a plethora of investigations have been conducted as these vesicles are considered an ideal drug carrier for biologically active compounds. As aforementioned, these vesicles have a biocompatibility and biodegradability that surpasses many other drug carriers⁸. Liposome encapsulation technology (LET) brought many advantages as it increased the therapeutic index while reducing the side effects. Besides its ability to encapsulate both hydrophilic and lipophilic drugs it also enabled the effective delivery of biologically active substances with a narrowed therapeutic window to the target of interest⁹. Over the last 40 years, liposomology have significantly developed with some major improvements that made liposomes a relevant drug carrier. Liposomes are considered to evolve, based on the composition, from conventional, stealth, targeted and immune-liposomes to stimuli-responsive liposomes⁷. Conventional liposomes suffered uptake by the mononuclear phagocytic system (MNPS) cells decreasing its half-life and therefore not effectively delivering the drug to its target. Therefore, many strategies had been studied such as the PEGylation of liposomes in the late 1980s by Allen, T.M. and Chonn, A. that highly impacted its circulation time, being now known as “stealth” liposomes as they go unnoticed by the MNPS cells thus improving its half-time^{10,11}. This strategy broadened the horizons for liposomology, however liposomes still had poor targeting efficiency. In order to address this limitation, further developments were carried out achieving targeted liposomes. These liposomes differ from the “stealth” ones by containing polysaccharides, glycoproteins or specific ligands to both selectively and effectively deliver the drug to the target of interest. Furthermore, immunoliposomes (liposomes decorated with antibodies in their surface) were developed to enhance its retention in the desired tissues and stimuli-responsive liposomes were developed for controlled drug delivery^{7,12}. Liposomes were the first system to offer immunological adjuvant properties by Allison and Gregoriadis in 1974¹³. Besides the medical field, liposomes are also used in food and farming industries to encapsulate unstable substances (such as flavors, antioxidants, etc.) for grow delivery systems⁹. Although all the suitable applications that liposomes can be employed to, cancer therapy arouses more interest for further development.

The first nano-sized liposomal product approved by the FDA was Doxil[®] in 1995. Doxil[®] is a PEGylated liposomal formulation of doxorubicin and it is used for the treatment of patients with ovarian cancer, multiple myeloma and refractory AIDS-related Kaposi's sarcoma⁴. At the moment, there are fifteen liposome-based medicines approved by FDA for clinical use and many more are under clinical trials^{5,14}.

Liposomes have been widely employed in vaccines in order to improve its efficacy. Understanding how the lymphatic system works and how to enhance lymphatic targeting and retention of both the liposomes and entrapped antigen is imperative. The lymphatic system plays an important role as part of the immune system and functions as a secondary circulation system to drain excess fluids, proteins and waste products from the extracellular space into the vascular system¹⁵. Moreover, the lymphatic capillaries are mostly responsible for the absorption and uptake of drug into the lymphatic system and lymph nodes. As vaccines rely on the migration of Antigen Presenting Cells (APCs) to the lymph nodes, where T or B cells are particularly concentrated, it is critical to understand how to enhance its targeting, thus improving cellular and humoral immune responses. In this manuscript, I highlight the main strategies to improve liposome's drainage to the lymphatics and their retention after reaching the lymph nodes as other strategies to enhance transfection efficacy.

Over the years, many techniques to prepare liposomes at the laboratory scale were developed and optimized. These techniques can be divided into two major groups: conventional methods and microfluidic methods. The conventional methods include two different techniques: bulk methods and film methods. The first ones prepare liposomes by transferring phospholipids from an organic phase into an aqueous phase and include reverse-phase evaporation, freeze-drying and ethanol injection. The second ones prepare liposomes through deposition of lipid films on a substrate that will be hydrated in order to provide liposomes (rehydration method)¹. These methods can be categorized as top-down techniques since we breakdown large vesicles into small vesicles that often need membrane extrusion, sonication, homogenization and/or repetitive freezing and thawing in order to control the size and size distribution. Despite of being well-established, these methods have many disadvantages making them unsuitable for industrial production. The small batch size, the difficulty of tech-transferring, the necessity of using large volumes of organic solvents that might result in liposomal toxicity, the lack of reproducibility and the non-Good Manufacturing Practice (GMP) character of these methods are huge limitations. All these shortcomings hamper the manufacturing of liposomes at industrial scale under GMP conditions².

The microfluidic methods are described as novel methods as these techniques revolutionized how liposome's manufacturing was seen and emerged as a breakthrough technology capable of overcoming conventional methods' obstacles. Contrarily to conventional methods, these ones are bottom-up techniques as the liposome formation is achieved by self-assembly of the liposome's components. Microfluidic approaches include extrusion, pulsed jetting, electroformation and hydration, double emulsion templating,

transient membrane ejection, ice droplet hydration, droplet emulsion transfer and hydrodynamic focusing⁴. These methods provide a better control over the obtained liposome's physical properties, particularly in their size, size distribution and lamellarity. However, there are some issues that must be addressed on whether this technology is suitable or not on an industrial scale.

In this paper, I seek to approach these concerns by reviewing microfluidic methods reported in the literature with focus on microfluidic hydrodynamic focusing (MHF). I will address how microfluidic methods have improved liposome's production and why it is important to keep researching and improving these methods in order to develop and achieve a solid method to produce liposomes on an industrial scale under GMP conditions. Liposomal formulations have improved many people's health conditions that hadn't been addressed since, thus it is relevant seeking for a large-scale manufacturing process that attends these people's needs.

2. Research Methodology

Multiple databases were used for searching of articles on the topic during the data collection period, which span from 12th of June until 28th of August. Google Scholar and PubMed were utilized to conduct a preliminary screening on which articles were available. The search involved using terms that consisted of: *Microfluidics, liposome, production, vaccine adjuvants, technology, and devices*. In order to achieve narrowly-defined and appropriate articles, these terms were combined with the Boolean operator “AND” through the databases’ tool “Advanced Search”. After striking into various articles, I was able to select those that provided an *Abstract* with information that I found relevant to my literature review as well as the most cited. Some articles weren’t free to download, so I used the University of Coimbra Library that gave access to most of them. In addition to all the methods used to gather all the sources, the Snowball method played an important role as it conducted to foundational articles that the vast majority of recent articles still rely on. The Snowball method consists on locating a number of articles through the reference lists in relevant articles. Although these sources are often cited, a thorough search was conducted in order to identify which given information is still reliable, according to recent studies.

All sources were analyzed through several criteria. Firstly, the source had to be in sync with the objectives of the literature review. Secondly, I looked up into which journals the sources were in and analyzed their impact factor, if possible. Finally, I relied into recent published articles that go back to 2008 thus providing updated information.

I collected the data and analyzed it through Mendeley as it also eased the citation process in this paper.

3. Critical Analysis

3.1. Breakthrough of Liposomes as Vaccine Adjuvants

As we have been dealing with a global pandemic for the past year, vaccines have been playing a huge role in the prevention of COVID-19. Vaccines have improved and evolved tremendously over the past 50 years as they have become increasingly effective against infectious diseases, with smallpox being eradicated worldwide and more recently rinderpest. There are a variety of vector options when it comes to developing new vaccines. These options include live attenuated vaccines and non-live vaccines¹⁶. The first ones have on its composition pathogens that are weakened, genetically modified, or selected to be less virulent than its wild-type. Thus, live attenuated vaccines cause a mild type of infection by presenting the same antigens that the original pathogen presents which will lead to immune responses similar to those induced by the natural infection. In other words, they provide long-term immunity, strong humoral and cell-mediated protection. However, these vaccines have the disadvantage that immunocompromised individuals are at risk of severe illness or even death due to uncontrolled pathogen replication. The non-live vaccines, as the name suggests, do not contain live or infectious particles and therefore have a better safety profile, even in immunocompromised individuals. Nevertheless, these vaccines have the disadvantage of lacking effective long-term immunity, possibly requiring more than one dose or even adjuvants to enhance immunogenicity. These non-live vaccines may contain inactivated whole pathogens (inactivated vaccines) or parts of them such as proteins (subunit vaccines). To solve the low efficacy of immunization by these vaccines, adjuvants play an important role by enhancing and modulating the immunogenicity of the antigen¹⁷. Since live attenuated vaccines effectively self-amplify and replicate the immune response, these vaccines do not require adjuvants. So, adjuvants are commonly used for subunit vaccines because they can overcome the poor immunogenicity of these vaccines by enhancing pathogen recognition and triggering an immune response that resembles the natural innate immune response. Aluminum adjuvants were the first adjuvants used in licensed vaccines and have been used since the 1930s. However, this type of adjuvant has not been successful in preventing infections against pathogens that act through intracellular mechanisms¹⁸. Therefore, new adjuvants are needed to solve this problem and to tackle re-emerging diseases and newly emerging diseases.

Liposomes have achieved great popularity as vaccine adjuvants since they are being thoroughly studied for liposomal formulations in the treatment of cancer. Schmidt *et al.* are studying the cationic adjuvant formulation (CAF) 09b, as the name says: a cationic liposomal

adjuvant consisting of dioctadecyldimethylammonium bromide (DDA), polyinosinic:polycytidylic acid [poly(I:C)] and monomycoloyl glycerol analogue I (MMG) that is under phase I clinical trials against prostate cancer and in a neoepitope-based peptide cancer¹⁹. This liposomal adjuvant was first described by K.S. Korsholm *et al.* demonstrating that CAF09 is able to induce high CD8⁺ T-cell responses thus promoting higher protection in a preventive cancer model. Despite such achievement, it was shown that CAF09 was only suitable for therapeutic vaccines, and therefore further modifications are needed to be suitable for prophylactic vaccines. Also, the administration route highly influences the CD8⁺ T-cell induction as intraperitoneal (i.p.) has shown to achieve the optimal effect²⁰. As stated by Henriksen-Lacey and co-workers when administered intravenously, cationic liposomes aggregate and suffer a rapid clearance by the mononuclear phagocyte system. However, if the liposomal formulation is injected on-site and directly into the lymph nodes, the aggregation will promote a depot-effect extending the period of time that liposomes and therefore antigen are retained in the tissue^{21,22}.

The COVID-19 vaccine development has tremendously improved the mRNA delivery system technology. Moderna's COVID-19 vaccine is a lipid nanoparticle (LNP)-encapsulated mRNA whose LNP is a cationic liposome²³. As nucleic acids have anionic charge, they bound electrostatically to cationic lipids forming lipid nanoparticles due to the strong complexation of nucleic acids with the cationic lipids becoming promising gene carriers for biomedical applications as vaccine and gene therapies²⁴. Perrie and co-workers also state that, according to the literature, cationic liposomes have proven to be effective vectors with one downside that is its toxicity, nevertheless cationic lipids such as DDA and stearylamine have shown to have better immunogenic effects and many formulations are using 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium-propane (DOTMA) and 3 β -[N(N',N'-dimethylaminoethane)carbonyl]cholesterol (DC-Chol) that show having limited immunogenicity. As a drawback, there is evidence of anti-inflammatory effect that might conduct to a modified immune response pathway by the down-regulation of macrophage activity¹⁶. The employment of a cationic lipid mixture has one advantage over neutral lipid formulation that is its significant decrease in liposome size⁴.

As aforementioned, cationic liposomes show high retention at the injection site which Khadke *et al.* also stated through the cationic DOTAP whilst neutral [1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC:Chol)] and anionic [L- α -phosphatidylserine (PS) and 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol) (DMPG)] do not show any aggregation but a faster clearance. However, the DSPC:Chol:PS formulation showed the fastest clearance due

to the presence of the PS as it enhances liposomes' delivery and their entrapped moiety acting as a recognition signal for phagocytosis of macrophages compared to other anionic liposomes (clearance profiles translate to liposomes occurring at the draining lymph node, *i.e.*, translate to their bioavailability at the targeting site)¹⁵. This is highly relevant when it comes to targeting, as anionic and neutral liposomes suffer faster uptake by the macrophages, they then become the paramount option for the intramuscular (*i.m.*) route. Khadke *et al.* concluded that not only the charge affects the liposomes' uptake but also the chosen anionic lipid, which plays a key role within the formulation. Liposomes containing PS suffered a faster uptake by the macrophages compared to DMPG and neutral liposomes that can be reduced by PEGylation. Also, Khadke *et al.* studied the potential of the avidin/biotin complex mechanism to promote retention at the lymphatics as the anionic/neutral liposomes do not aggregate and therefore do not result in a depot-effect as the cationic ones. The results confirmed its potential as this complex was able to enhance the retention and uptake by secondary lymph nodes such as the inguinal and mesenteric ones. At the moment, avidin-biotin linkage is the strongest non-covalent interaction between a ligand and protein, being then a potential strategy to target the lymphatics with advantages such as low toxicity and the ability to increase the chemotherapeutical dose¹⁵.

One strategy that could enhance the transfection efficacy of cationic liposomes carrying nucleic acid-based vaccines is including fusogenic lipids that help to deliver effectively the load to its target. Perrie and co-workers stated in their manuscript that, according to the literature, choosing fusogenic lipids is important as 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) is less effective than 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine (DOPE) to create membrane/membrane interactions easing liposome's incorporation into the target cell. PEGylation is another strategy widely implemented that provides the well-known "stealth" liposomes which is seen as a double-edged sword since it makes them "invisible" to the host immune system but can also improve their ability to stay in the organism for an undesired time decreasing transfection and endosomal escape efficacy at the same time¹⁶. So, it is fundamental to understand how every charged lipid interact with other lipids, such as fusogenic lipids, and which combination provides the better outcome for a specific purpose.

Polydispersity index (PDI) and particle size are critical quality attributes (CQAs) according to the FDA²⁵, that highly impact lipid-based nanocarriers efficacy by affecting their stability, biodistribution and bioavailability^{16,25,26}. It was shown by Nagayasu *et al.* that liposomes with an average size of 100 nm may represent the optimal size for longer retention in tumor tissue although it is not always effective for blood-to-tumor transfer but may be a pivotal size

for improved bioavailability²⁶. PDI is described as a representation of the heterogeneity degree of a size distribution of particles²⁵. It is an important characteristic as it shows if a determined method is robust enough to produce a monodisperse population of liposomes since it affects the quality of the end-product. Although being a CQA there is no criteria for an acceptable PDI, thus it is urgent to define PDI criteria in the “Guidance for Industry” to assist in liposome production improving liposomal drug products quality²⁵.

Liposomes are becoming more and more well-recognized as vaccine adjuvants, but more efforts are needed in order to attend the need for new vaccines. In designing liposomes, the administration route chosen is fundamental as the cationic liposomes are suitable for the i.p. route and the anionic or neutral liposomes being ideal for the i.m. route. However, there is limited data to compare different lipid mixtures and even between anionic, neutral and cationic lipids. Therefore, there is the need to further investigate and compare the differences between the vast combinations of lipids in order to provide a robust conclusion on which lipid or mixture of lipids enhances biodistribution, bioavailability and even biocompatibility. Also, it is fundamental to understand which composition, charge and size of the liposome is suitable for each administration route, targets, etc., yielding a plethora of data that would help to build a virtual library with every available lipid and mixture of lipids linking them to a specific liposomal formulation proper to a certain biotechnological or biomedical application.

Besides some of the issues beforementioned, one major issue is the lacking of a manufacturing process for mass production of liposomes under GMP conditions as well as the equipment to support it, discussed in the forward chapter.

3.2. Current Development in Microfluidic Methods and Devices

Microfluidic methods are techniques that intersect microchannels containing nanolitre volumes of fluids that are manipulated with a precise control in a geometrically constrained volume, usually in submillimeter lengths with a low Reynolds number^{6,27}. Microfluidics exploit a chemical process consisting of an “anti-solvent approach”, *i.e.*, a stream of lipids dissolved in organic solution flow through a central channel of the device that is intersected and sheathed by two lateral streams of aqueous solution (“anti-solvent”) at a flow rate and flow rate ratio already set. The constrained microchannels facilitate laminar flow and diffusive mass transfer resulting in the precipitation of the lipids as nanoparticles – liposomes²⁷ (Figure 2). Macroscale methods have been being developed in the last three decades whilst microfluidic techniques

surged as adaptations of the aforementioned methods or as completely new techniques in order to address many limitations that the traditional bulk methods face until these days. These limitations include: limited process control and robustness, lack of reproducibility and ineffective use of materials and reagents⁶. Microfluidic technology is easily scalable and its bench procedures can be set for continuous production into small devices, such as planar chips, and still providing a high-throughput and analytical performance^{6,19}.

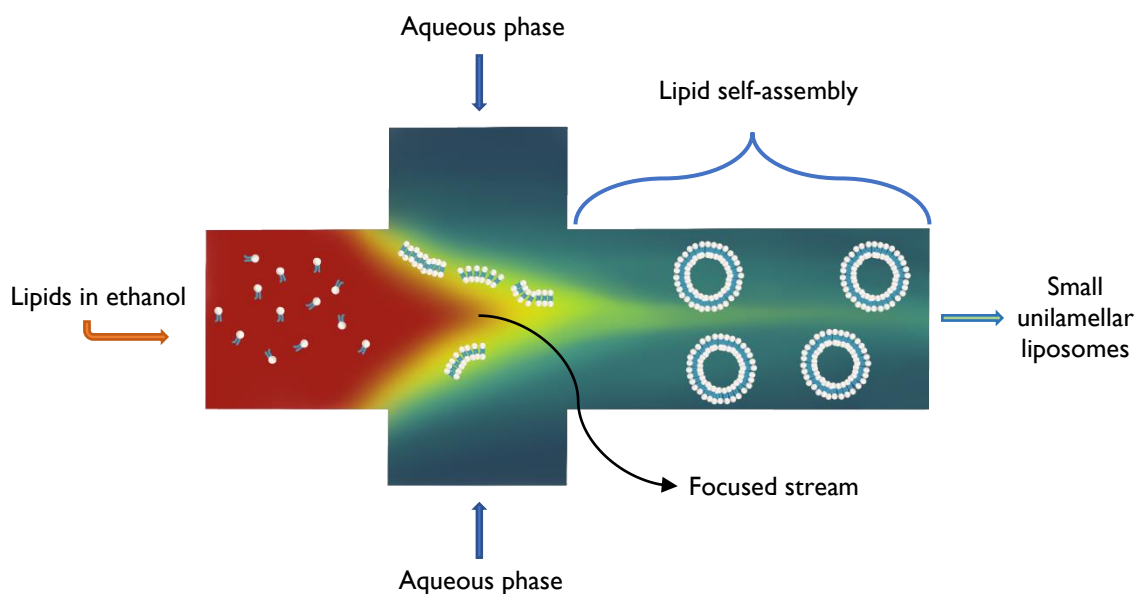


Figure 2. Schematic representation of a MHF microdevice and the process of liposome formation. (Adapted from: CARUGO, Dario *et al.* - Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. *Scientific Reports*. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–15; SWAAY, Dirk VAN; DEMELLO, Andrew - Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip*. ISSN 14730189. 13:5 (2013) 752–767; JAHN, Andreas *et al.* - Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. *Journal of the American Chemical Society*. ISSN 00027863. 126:9 (2004) 2674–2675.)^{4,6,28}

As aforementioned, this promising technology includes many procedures although only few are able to produce liposomes with potential for clinical application such as MHF that produces homogeneous SUVs in both size and lamellarity with 50-150 nm in size throughout a continuous process with low polydispersity indexes (PDI) improving stability and functionality of the formulation^{16,19}. Van Swaay and deMello carried out an extensive review comparing each existing microfluidic method by examining the properties of the produced liposomes thus providing relevant information on which method is suitable for a given biological application⁶. Electroformation is the most common method used for vesicle production which suffered many modifications along the way to address the limitations that it

presented until those days. One simple modification that enabled the first implementation of electroformation within microfluidic channels on a single chip was performed by Kuribayashi *et al.* in 2006 by coating an electrode with a dried lipid film with two sheets made of silicone over it^{6,29}. Although it was able to perform electroformation within micro-channels, it resulted in a polydisperse population of GUVs thus still not applicable for pharmaceutical purposes as the electric field is a huge downside that most likely degrade proteins sensitive to electric fields^{29,30}. LeBerre *et al.* carried out further investigation showing that is possible to control size and size distribution through spreading the phospholipid film on patterned elevated microstructures of silicon creating fragments of the lipid film^{31,32} (Figure 3). This improvement enabled the formation of a monodisperse population of liposomes.

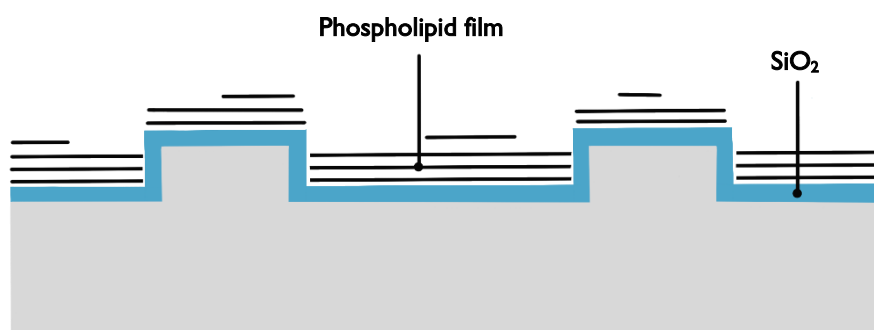


Figure 3. Illustration of a patterned silicon electrode. (Adapted from: SWAAY, Dirk VAN; DEMELLO, Andrew - Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip*. ISSN 14730189. 13:5 (2013) 752–767.)⁶

Hydration is a similar method compared to electroformation without an electric field applied^{6,30}. By not applying an electric field, this method has the advantage over the electroformation by not degrading proteins sensitive to electric fields. However, it has the downside of not providing process control over lamellarity, size and size distribution resulting in a polydisperse and multilamellar population of vesicles³³. Moreover, hydration is highly sensitive to the type of phospholipid employed limiting its application for encapsulation⁶. As electroformation, hydration suffered alterations aiming to tackle some of the limitations, and therefore Lin *et al.* developed a microfluidic device employing a similar method to that of Kuribayashi *et al.* although this method only produces microtubules and sometimes nanotube-vesicle networks³⁴. As stated by van Swaay, these two microfluidic methods are not suitable for drug delivery as they have low encapsulation efficacy and are time-consuming processes that require the lipid film to be desiccated over several hours before setting up the

microchannels. This results in low-throughput methods as it hampers the continuous process of the device⁶.

Nonetheless, other strategies, such as the active loading technique, can be employed to improve the entrapment efficacy of hydrophilic drugs in the lipid film hydration method that is widely used to produce many approved liposomal formulations such as Doxil[®] and Vyxeos^{®35}. Although this strategy improves its low encapsulation efficacy, bulk hydration of lipids results in polydisperse MLVs which are not suitable for drug delivery applications. Therefore, postprocessing steps are required in order to reduce particle size, such as sonication, freeze thawing, homogenization and extrusion. As stated by Shah *et al.* these postprocessing steps have their advantages accompanied by a downside. Sonication enables a fast reduction of particle size but its high-generated heat by the energy dissipated can degrade phospholipids and heat sensitive drugs. Freeze thawing can be used to reduce particle size and turn MLVs into SUVs or LUVs although producing a polydisperse population of vesicles. Homogenization is also used as a batch process and to reduce particle size through high-pressure homogenizers³⁵. Conventional bulk methods for production of liposomes are multi-step processes resulting in the limitations aforementioned. Shah *et al.* carried out a comprehensive study comparing extrusion and microfluidics for scale-up purposes. Extrusion is the gold standard method for size reduction yet resulting in highly polydisperse liposomes. There were challenges in scale-up optimization of the extrusion platform for liposome production, and it was shown that using the microfluidics platform generated liposomes with similar *in vitro* and *in vivo* activity compared to those formed by extrusion³⁶.

Thus, microfluidics is able to include all the multiple steps of the conventional methods into a single one and still providing the same *in vitro* and *in vivo* characteristics within a monodisperse population of liposomes compared to extrusion. So, attending to the difficulty on scaling-up using the extrusion platform, microfluidics provides a reliable choice as it enables the translation from bench to clinic.

Jahn *et al.* described MHF for the first time in an effort to circumvent the limitations of top-down methods resulting in a technique that enables size controlling during liposome formation and therefore becoming more suitable for large-scale production than its bulk counterparts²⁸. After reporting MHF for the first time in 2004, Jahn *et al.* performed significant changes to the system in 2007 that broaden the horizons of this promising technology as it elucidated the underlying mechanism of MHF and improved the ability to control liposome size. In their work, two outer adjacent aqueous streams hydrodynamically focus an inner lipid

containing IPA stream. As the alcohol stream width reduces so does the IPA concentration along the microchannel in laminar flow conditions and the fluid mixing is based on molecular diffusion. The inner stream is then focused into a thin sheet where the lipid monomers self-assemble into liposomes at a critical alcohol-to-water ratio. It was also shown that the flow rate ratio (FRR) dictates the central stream width and not the shear forces between the adjacent streams, and therefore FRR is the major factor that impacts liposome size and size distribution³⁷.

According to Van Swaay and deMello, there was no analogous protocol at the macroscale for the MHF method⁶. Carugo *et al.* addressed this issue by using “controlled” ethanol injection as a bulk method since it was similar to MHF liposome formation compared to other bulk techniques (Figure 4). Although there were no significant changes in dimensional stability over time for both methods, it was shown that the MHF method produced smaller and more uniform liposomes than those generated by the “controlled” ethanol injection. MHF provides a relevant feature compared to its bulk counterparts: it enables the production of liposomes with a wider range of mean sizes (50-150 nm) by only changing the hydrodynamic conditions such as FRR and total flow rate (TFR)⁴. Balbino *et al.* carried out an investigation comparing the generated liposomes by two different microfluidic devices in order to study if using high lipid concentrations would affect liposome size, size distribution, polydispersity index and transfection efficacy as liposomes with low lipid concentration are not suitable in the field of vaccine and gene therapy. It was shown that high lipid concentration and low FRR generated liposomes with the highest lipid concentration through a simple microfluidic device. The study also raises the possibility that higher total volumetric flow rates would result in increased productivity which wasn't shown by Jahn *et al.*³⁸. Carugo *et al.* postulated in their work that, according to several investigations carried out to discover the effect of microfluidic parameters on liposome attributes, the TFR has small impact on size whilst the lipid concentration directly impacts the mean diameter and the FRR is inversely related to it, *i.e.*, as the lipid concentration increases so does the mean diameter of the liposomes while decreasing the FRR increases the mean diameter. In comparing the “controlled” ethanol injection method and the MHF method, Carugo *et al.* found that both ethanol and lipid concentration had effect on liposome size, whereas the increasing ethanol content resulted in decreased liposome size and, as aforementioned, the increasing lipid concentration increases liposome size, being possible to counterbalance each other effects resulting in constant size of the generated liposomes. Moreover, it was concluded that microfluidics produces small and

uniform liposomes using high concentrations of lipids achieving liposomes with lipid concentrations that fall within the range of the majority of formulations⁴.

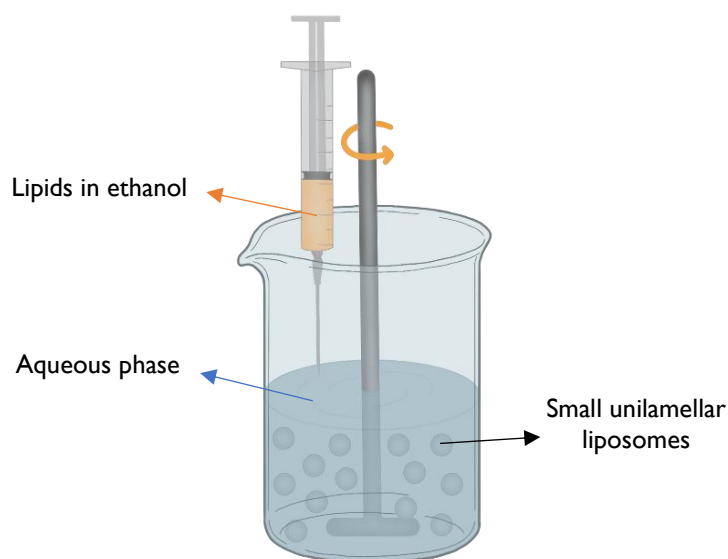


Figure 4. Schematic representation of the “controlled” ethanol injection procedure. (Adapted from: CARUGO, Dario *et al.* - Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. Scientific Reports. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–15.)⁴

Schmidt *et al.* evaluated how the ethanol, lipid, and dimethyl sulfoxide (DMSO) concentration influence the physicochemical attributes of CAF09b, already mentioned above as a promising liposome adjuvant for cancer therapy. Moreover, the induction of immune responses by CAF09b prepared by microfluidics was also evaluated. This study also stated that the TFR do not affect the physicochemical attributes of the liposomes and that the FRR is the major factor impacting particle size whilst TFR only affects the speed of manufacture also according to Sedighi *et al.* and Balbino *et al.*^{19,38,39}. Also, Schmidt *et al.* concluded that both high ethanol and DMSO concentrations result in the smallest particle size and that PDI values are affected not only by the aforementioned but also by the lipid concentration. It was able to optimize CAF09b manufacturing within defined parameters that produce liposomes with acceptable physicochemical attributes creating Quality by Design (QbD) principles for CAF09b. As expected, the ethanol concentration is the core process factor that influences the outcomes on zeta potential, particle size, and colloidal stability. Including DMSO to the aqueous phase of CAF09b promoted the colloidal stability, however there is the possibility of causing adverse effects on the cells at the injection site, and therefore an alternative to DMSO is needed for CAF09b manufacture to comply with GMP conditions¹⁹. Further investigations on the alternative are needed to conclude if its ability to enhance colloidal stability enables the

use of increased lipid concentrations as it would allow the production of CAF09b liposomes with a wider range of lipid concentrations.

Even though the mean particle size of the CAF09b samples generated by microfluidics was less than 200 nm, a terminal sterilization is preferred as the sterile filtration is not suitable due to the cationic nature of CAF09b, and according to Schmidt *et al.*, aseptic production might be the optimal sterilization process as it would enable microfluidic GMP production within a single-step process as all the equipment would be pre-sterilized¹⁹.

In concerning to the production of cationic liposomes that, according to all the data presented before, are the best liposome adjuvants in the field of vaccine, cancer and gene therapy, QbD principles have been defined using the MHF method. However, it is important to understand which microdevice is suitable for large-scale production. Carugo *et al.* constructed three different microfluidic devices in order to address how the chip geometry and material characteristics affect the liposome preparation. It was concluded that size and size distribution are influenced not only by the FRR but also the device size and architecture. However, the chip with the smallest channels and two interfaces for ethanol diffusion produced liposomes with sizes between 30 and 80 nm⁴. As aforementioned, this is of particular importance since it increases the plasma half-life as sizes of 50 nm or lower highly reduce the uptake by the mononuclear phagocyte system, *i.e.*, prolongs the residence of the therapeutic agents²⁵. As the mean size of CAF09b liposomes is 50 nm, this chip architecture might be a promising one for its large-scale manufacture. Although the particle size does not impact the adjuvanticity of CAF09b, it is useful as a control parameter for manufacturing¹⁹. Schmidt *et al.* stated that altering the manufacturing method does not influence the adjuvanticity of CAF and bearing in mind the fact that the lipid film hydration method requires postprocessing steps and the microfluidics method can be implemented in one single-step process, besides many other advantages beforementioned, further development must be carried on to improve this promising method.

Finally, the encapsulation of drugs through MHF was assessed by Carugo *et al.* As a model drug, it was used ivermectin. It was demonstrated that ivermectin did insignificant influence in the liposome size generated by MHF, as the liposomes containing ivermectin were slightly larger than the empty ones. Nevertheless, the encapsulation efficiency was remarkable: over 95%⁴. However, there have been few developments made in on-chip liposome loading with therapeutic agents, representing subject for future research.

MHF devices can be used to produce liposomes through a planar 2D geometry, a 3D geometry, a droplet-based microchannel and a staggered herringbone mixer (SHM) channel design (Figure 5). The 3D geometry surpasses the 2D geometry by providing a more efficient mixing avoiding aggregation at the microchannel walls as the capillary where the solvent stream is introduced is surrounded by the anti-solvent stream. There are other common geometries such as the droplet-based microfluidic system and one of the most common passive mixers, the SHM²⁷. In producing plasmid DNA/cationic liposome (pDNA/CL) complexes, the SHM originated liposomes within a narrowed-size distribution that the planar 2D geometry wasn't able to²⁴. By disturbing the laminar flow within the microchannel, the SHM geometry causes the mixing of fluids to occur through chaotic advection²⁷. However, a critical comparison between all MHF geometries is required to provide a more robust answer to which architecture is suitable for manufacturing specific liposomes.

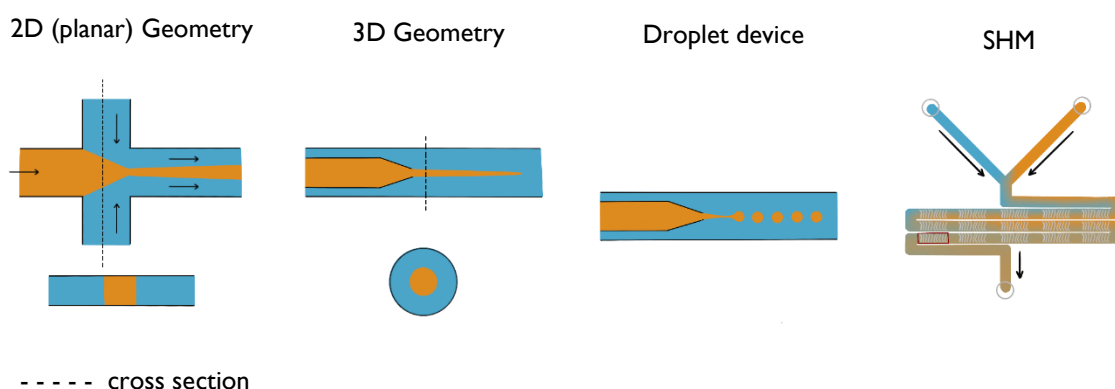


Figure 5. Illustration of different microfluidic devices and its flow patterns to produce nanoparticles. (Adapted from: SHAH, Sanket *et al.* - Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Advanced Drug Delivery Reviews*. ISSN 18728294. 154–155 (2020) 102–122.)³⁵

Carugo *et al.* also investigated two different easy-to-handle microfluidic chips, made of different materials with one using a cross-junction geometry (chip 1) and the other using a MHF geometry (chip 2) (Figure 8). Both chips were constructed using an in-house technique that is easy to perform and cost-effective: μ Mi-REM (Figure 6). It was shown that, compared to other MHF architectures reported in the literature, the chip representing a scaled-up version of conventional MHF architectures produced clinically relevant liposomes with a significantly higher TFR than any other reported in studies. However, this scaled-up version showed contrary results to those achieved by the microscale counterpart as the increasing

TFR reduced liposome size and the increasing FRR increased the liposome size⁴. This is highly relevant in concerning to scale-up purposes as the hydrodynamic conditions of the scaled-up architecture differ from those of the microscale geometries and therefore further investigations are needed.

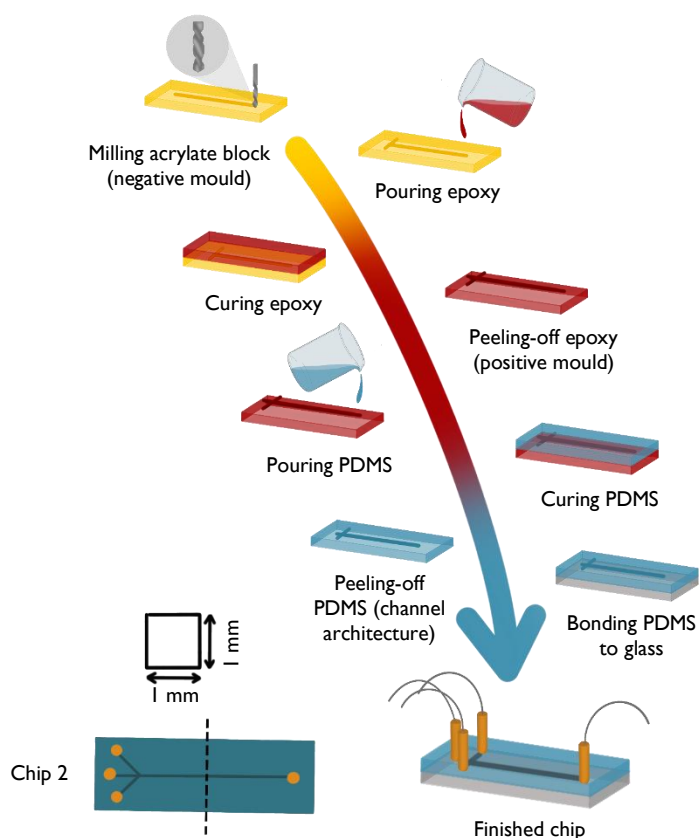


Figure 6. Illustration of the in-house method (μ Mi-REM) to produce both chips (one represented in this figure and the other in Fig. 7). (Adapted from: CARUGO, Dario *et al.* - Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. Scientific Reports. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–15.)⁴

Relatively to the chip constructed with “off-the-shelf” components, it was able to produce liposomes with properties relevant for biomedical applications. There are two ways to translate microfluidic methods to an industrial level: one based in cost-effective microfabrication technologies and the other based in “off-the-shelf” components that are usually used for high performance liquid chromatography (HPLC) procedures. It is also reported that the use of “off-the-shelf” components could ease the implementation of parallelized networks thus improving the throughput and the velocity of the liposome production (Figure 7). These components also present low variability between all the samples being highly relevant for parallelization purposes. However, a more comprehensive

understanding on how the microfluidic architectures influence liposome characteristics and whether they are beneficial for scaling-up purposes needs to be carried out⁴.

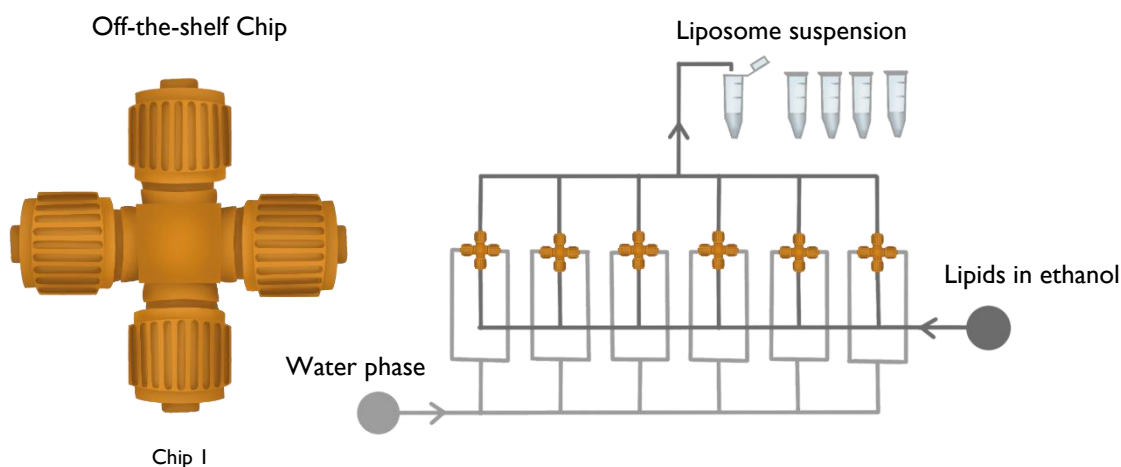


Figure 7. Illustration of a potential parallelized network for mass production of liposomes using an off-the-shelf chip. (Adapted from: CARUGO, Dario *et al.* - Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. Scientific Reports. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–15.)⁴

Chip number	Material	Geometry	Channel dimensions (width/depth, μm) (length, mm)	Channel angle ($^\circ$)
Chip 1	PEEK	Cross-junction	790/790; 60	90
Chip 2	PDMS/glass	MHF	1000/1000; 40	30

Figure 8. Geometrical characteristics of both chips constructed by $\mu\text{Mi-REM}$ for liposome production. (Adapted from: CARUGO, Dario *et al.* - Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. Scientific Reports. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–15.)⁴

4. Summary

Liposomes are indeed a promising drug carrier that might overcome all the other drug delivery systems' limitations. In designing liposomes for a specific medical application, their physicochemical characteristics are extremely important to consider. As aforementioned, particle size and PDI are CQAs. Particle size have a huge impact on targeting but also on liposome half-life time as smaller vesicles (<50 nm) have its circulation time increased by evading the MNPS. Although smaller particles have this particularity over larger liposomes (>50 nm), there are still strategies for larger particles being able to avoid the MNPS such as the PEGylation. Still, smaller liposomes are desirable for anti-cancer drug delivery due to the EPR effect, nevertheless there is still the need to make them more selective in order to effectively deliver the drug to the desired target. Strategies such as "decorating" the liposome's surface with glycoproteins, polysaccharides or specific ligands that will bind to specific receptors of the target of interest thus improving the targeting. It was also shown that the particle size of 100 nm would be the optimal size for longer retention in tumor tissue, yet further investigations are needed to clarify which particle size is the most suitable for specific tumor tissues as 100 nm being the pivotal size for future studies. Moreover, in terms of lamellarity, it is mostly common to employ unilamellar liposomes although there are few biomedical applications that utilize MLVs as drug carriers.

Liposomes have been widely studied as vaccine adjuvants as I highlighted the CAF09b in this manuscript. This liposomal adjuvant is a cationic liposome that is under clinical trial for cancer treatment. However, CAF09b can be implemented for prophylactic vaccines as cationic liposomes are more suitable than the anionic ones due to its capacity to highly induce CD8+ T-cell responses when administered by the i.p. route. Cationic liposomes differ from the anionic ones not only because they enable to be produced smaller but also for its ability to promote a depot-effect by aggregating when injected on-site. Each charged liposome has its specificities according to the charge as anionic liposomes are suitable for a medical application that the cationic ones are not. Anionic liposomes are more suitable for the i.m. route due to its faster uptake by the macrophages, however the chosen anionic lipid will dictate how fast the uptake will be. Liposomes containing PS showed the fastest clearance improving liposomes' delivery and their entrapped moiety as the PS acts like a recognition signal for phagocytosis by macrophages when other anionic lipids do not show the same clearance profile becoming a useful strategy for targeting the lymph nodes on vaccine therapy. Another strategy that was aforementioned is the use of the avidin/biotin complex mechanism that showed a huge potential to employ when a depot-effect at the lymphatics is needed - one of the limitations

of the anionic liposomes. The avidin/biotin complex mechanism showed promising results as it was able not only to enhance the retention and uptake by the lymphatics but also by the secondary lymph nodes. There is also a novel strategy to enhance the transfection efficacy of cationic liposomes containing nucleic acids for vaccine and gene therapy that is the including of fusogenic lipids. This strategy highly helps to effectively deliver the drug to the target by stabilizing the membrane/membrane interactions easing liposome's incorporation.

As aforementioned, PDI was classified as a CQA by the FDA and it defines the heterogeneity degree of a liposome population. This attribute is highly relevant as it provides the quality degree of a certain production method. A high-quality liposomal drug product requires a robust method capable of producing a monodisperse population of liposomes, yet strict-criteria is lacking and must be provided in the "Guidance for Industry" in order to assist liposome production.

Despite all the accomplishments achieved throughout all the research conducted on liposomes, there is limited data in order to provide a robust comparison between lipids, lipid mixtures and combinations of lipids on which is the suitable option for a determined biomedical application. Building a virtual library that links each lipid, lipid mixtures and combinations of lipids to a specific medical application through artificial intelligence able to gather all the information of researches that studied the biocompatibility, bioavailability and biodistribution of them easing its choice and, therefore, reducing the time to find the best liposomal formulation.

Liposomes have highly improved the drug therapeutic index due to its better biocompatibility and biodegradability compared to many other drug delivery systems. However, there is the lacking of a suitable method for large-scale production under GMP conditions. As it was shown, many alterations have been done on traditional bulk methods in order to provide a more robust technique capable of producing high-quality liposomal drug products. One modification that overcame many of bulk methods limitations was the adaptation of those methods employing microfluidic techniques. Microfluidics consists of exploiting a chemical process based on an "anti-solvent" approach where a stream of an organic solution containing lipids flows in a central channel of a microdevice being then intersected by two streams of aqueous solution. As these fluids are handled in a geometrically constrained volume, usually in submillimeter lengths with a low Reynolds number, microfluidic methods provide lower costs of chemical and biological experimentation and, concurrently, higher throughput and analytical performance.

One of the major issues of bulk methods is the production of a polydisperse population of MLVs that require post-process steps to control the size and size distribution. Adding to this issue, there are many other limitations associated to bulk methods such as the necessity of using large volumes of organic solvents increasing the risk of toxicity, lack of reproducibility, small batch size and the non-GMP character of these methods. Microfluidic approaches differ from their bulk counterparts as these are bottom-up techniques which, besides providing a better control over the obtained liposome's physical properties, also have greater reproducibility. Microfluidic methods include pulsed jetting, extrusion, electroformation and hydration, double emulsion templating, ice droplet hydration, transient membrane ejection, droplet emulsion transfer and hydrodynamic focusing. In this review I focus on MHF as a potential microfluidic approach for large-scale manufacturing of liposome-based vaccines. It was demonstrated that MHF is able to continuously produce homogeneous SUVs in both size and lamellarity with 50-150 nm improving stability and functionality of the formulation. Although many microfluidic methods that surged as adaptations of its bulk counterparts overcame some limitations, they still showed other issues such as low encapsulation efficacy and production of multilamellar vesicles with high PDIs, still requiring postprocessing steps (sonication, homogenization, freeze thawing and extrusion).

MHF surged as a completely new technique and showed promising results as it enabled the fine tuning of liposome size by adjusting the FRR and TFR (FRR is the major parameter that affects liposome size and size distribution by determining the central stream width). Recently it was able to find an analogous bulk method to compare with MHF: "controlled" ethanol injection. This has broadened MHF horizons as it is possible to demonstrate that MHF exceed its bulk counterpart by being capable of producing smaller liposomes with better PDIs. Besides MHF provides a relevant feature: it enables the production of liposomes with a wider range of mean sizes by adjusting the hydrodynamic parameters (FRR and TFR, being the FRR the parameter that affects particle size and TFR the factor impacting the speed of manufacture).

QbD principles were defined for CAF09b manufacture through MHF although the use of DMSO has raised some issues such as the possibility of causing adverse effects on the cells at the injection site requiring further investigations to find a suitable alternative in order to comply with GMP conditions. However, a terminal sterilization is preferred, so, in order to address this issue, aseptic production might be the paramount sterilization process as it enables to produce CAF09b liposomes within a single-step process complying with GMP conditions. Also, MHF ability to efficiently encapsulate drugs was assessed showing remarkable

results although further developments are needed to study the encapsulation efficiency on-chip for many other biologically active compounds.

In order to implement MHF as the optimal manufacturing method it is important to understand which microdevice is suitable for a large-scale purpose. It was concluded that both chip geometry and material characteristics impact the liposome preparation as well as the device size and architecture influencing the size and size distribution. The chip with the smallest channels and two interfaces for ethanol diffusion produced liposomes with 30 to 80 nm becoming a promising architecture for the large-scale manufacture of CAF09b. Moreover, two different microfluidic chips for scale-up purposes (one using a cross-junction geometry and the other MHF geometry) have proven that the microscale counterpart shows that some conditions may vary when we translate to the scaled-up version with TFR playing a key role as well as the FRR. The geometry used in microdevices plays an important role as the 3D geometry surpasses the 2D geometry by efficiently mix the fluids avoiding aggregation at the microchannel walls. Besides these two geometries, microdevices with a droplet-based microchannel and a SHM channel design are commonly used. In concerning to the components used to build the chips, “off-the-shelf” materials may ease the implementation of parallelized networks improving the throughput and speed of liposome manufacturing compared to cost-effective microfabrication technologies. However, a more comprehensive and extensive study is needed so it is possible to conclude how the microfluidic architectures and the materials used to build microdevices affect liposome characteristics for large-scale manufacturing.

5. Conclusions

Liposomes have tackled many problems that other drug carriers have not been able to. Vaccine adjuvants highly improve vaccine stability and efficacy where liposomes have proven to offer a strong adjuvant platform. Over the last decade a promising liposomal adjuvant has shown remarkable results for cancer therapy as well as a potential vaccine adjuvant. However, the existing liposome manufacturing methods comprise many limitations to scale up for commercial production. Liposome manufacturing technology has seen many new developments trying to address the limitations of traditional bulk methods, such as lipid rehydration methods. Microfluidic technology has already demonstrated capable of producing liposome-based adjuvants through a single-step rather than a complex and time-consuming multi-stage protocol presented by the bulk methods. Besides, MHF methods are easily scalable from bench to clinic, nevertheless there are limiting factors that must be addressed as how FRR and TFR behave may vary from microscale to macroscale requiring further investigations in order to achieve a more comprehensive understanding on how operational parameters as well as the architecture and materials of the microdevices influence the final liposomal formulation characteristics for scale-up purposes. Thus, as further developments address these issues, MHF methods may become the paramount choice for large-scale manufacturing of liposome-based drug products, such as vaccines.

6. References

1. PATIL, Yogita P.; JADHAV, Sameer - Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**. ISSN 18732941. 177 (2014) 8–18.
2. PENOY, Noémie *et al.* - A supercritical fluid technology for liposome production and comparison with the film hydration method. **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 18733476. 592:November (2021).
3. SHARMA, Amarnath; SHARMA, Uma S. - Liposomes in drug delivery: Progress and limitations. **International Journal of Pharmaceutics**. ISSN 03785173. 154:2 (1997) 123–140.
4. CARUGO, Dario *et al.* - Liposome production by microfluidics: Potential and limiting factors. **Scientific Reports**. ISSN 20452322. 6 (2016) 1–15.
5. BULBAKE, Upendra *et al.* - Liposomal formulations in clinical use: An updated review. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 9:2 (2017) 1–33.
6. SWAAY, Dirk VAN; DEMELLO, Andrew - Microfluidic methods for forming liposomes. **Lab on a Chip**. ISSN 14730189. 13:5 (2013) 752–767.
7. ISALOMBOTO NKANGA, Christian *et al.* - General Perception of Liposomes: Formation, Manufacturing and Applications. **Liposomes - Advances and Perspectives**. (2019).
8. BOZZUTO, Giuseppina; MOLINARI, Agnese - Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 11782013. 10 (2015) 975–999.
9. AKBARZADEH, Abolfazl *et al.* - Liposome: classification , prepNew aspects of liposomesaration , and applications. **Nanoscale Research Letters**. 8:102 (2013) 1–9.
10. ALLEN, Theresa M.; HANSEN, Christian; RUTLEDGE, Jennifer - Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. **BBA - Biomembranes**. ISSN 00052736. 981:1 (1989) 27–35.
11. ALLEN, T. M. *et al.* - Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo. **BBA - Biomembranes**. ISSN 00052736. 1066:1 (1991) 29–36.
12. TORCHILIN, Vladimir P. - Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. **Nature Reviews Drug Discovery**. ISSN 14741776. 4:2 (2005) 145–160.

13. ALLISON, A. C.; GREGORIADIS, G. - Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**. ISSN 1476-4687. 252:5480 (1974) 252.
14. BELTRÁN-GRACIA, Esteban *et al.* - **Nanomedicine review: Clinical developments in liposomal applications** [S.l.]: Springer Vienna, 2019 Disponible em: <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y>. ISBN 1264501900.
15. KHADKE, Swapnil *et al.* - Formulation and manufacturing of lymphatic targeting liposomes using microfluidics. **Journal of Controlled Release**. ISSN 18734995. 307:March (2019) 211–220.
16. PERRIE, Yvonne *et al.* - Designing liposomal adjuvants for the next generation of vaccines. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169-409X. 99 (2016) 85–96.
17. VETTER, Volker *et al.* - Understanding modern-day vaccines: what you need to know. **Annals of Medicine**. ISSN 13652060. 50:2 (2018) 110–120.
18. PASQUALE, Alberta DI *et al.* - Vaccine adjuvants: From 1920 to 2015 and beyond. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 3:2 (2015) 320–343.
19. SCHMIDT, Signe Tandrup; CHRISTENSEN, Dennis; PERRIE, Yvonne - Applying microfluidics for the production of the cationic liposome-based vaccine adjuvant caf09b. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 12:12 (2020) 1–17.
20. KORSHOLM, Karen Smith *et al.* - Induction of CD8+ T-cell responses against subunit antigens by the novel cationic liposomal CAF09 adjuvant. **Vaccine**. ISSN 18732518. 32:31 (2014) 3927–3935.
21. HENRIKSEN-LACEY, Malou *et al.* - Liposomes based on dimethyldioctadecylammonium promote a depot effect and enhance immunogenicity of soluble antigen. **Journal of Controlled Release**. ISSN 01683659. 142:2 (2010) 180–186.
22. HENRIKSEN-LACEY, Malou *et al.* - Liposomal cationic charge and antigen adsorption are important properties for the efficient deposition of antigen at the injection site and ability of the vaccine to induce a CMI response. **Journal of Controlled Release**. ISSN 01683659. 145:2 (2010) 102–108.
23. PARK, Kyung Soo *et al.* - Non-viral COVID-19 vaccine delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169-409X. 169 (2021) 137–151.

24. BALBINO, Tiago Albertini; AZZONI, Adriano Rodrigues; LA TORRE, Lucimara Gaziola DE - Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. ISSN 09277765. 111 (2013) 203–210.
25. DANAEI, M. *et al.* - Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**. ISSN 19994923. 10:2 (2018) 1–17.
26. NAGAYASU, A.; UCHIYAMA, K.; KIWADA, H. - The size of liposomes: A factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169409X. 40:1–2 (1999) 75–87.
27. STRECK, Sarah *et al.* - Microfluidics for the Production of Nanomedicines: Considerations for Polymer and Lipid-based Systems. **Pharmaceutical Nanotechnology**. ISSN 22117385. 7:6 (2019) 423–443.
28. JAHN, Andreas *et al.* - Controlled Vesicle Self-Assembly in Microfluidic Channels with Hydrodynamic Focusing. **Journal of the American Chemical Society**. ISSN 00027863. 126:9 (2004) 2674–2675.
29. KURIBAYASHI, K. *et al.* - Electroformation of giant liposomes in microfluidic channels. **Measurement Science and Technology**. ISSN 13616501. 17:12 (2006) 3121–3126.
30. FILIPCZAK, Nina *et al.* - Recent advancements in liposome technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. 156 (2020) 4–22.
31. BERRE, Maël LE *et al.* - Electroformation of giant phospholipid vesicles on a silicon substrate: Advantages of controllable surface properties. **Langmuir**. ISSN 07437463. 24:6 (2008) 2643–2649.
32. DIGUET, Antoine *et al.* - Preparation of phospholipid multilayer patterns of controlled size and thickness by capillary assembly on a microstructured substrate. **Small**. ISSN 16136810. 5:14 (2009) 1661–1666.
33. HISHIDA, M. *et al.* - Hydration process of multi-stacked phospholipid bilayers to form giant vesicles. **Chemical Physics Letters**. ISSN 00092614. 455:4–6 (2008) 297–302.

34. LIN, Yu Cheng *et al.* - Manipulating self-assembled phospholipid microtubes using microfluidic technology. **Sensors and Actuators, B: Chemical**. ISSN 09254005. 117:2 (2006) 464–471.
35. SHAH, Sanket *et al.* - Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 18728294. 154–155 (2020) 102–122.
36. SHAH, Vidhi M. *et al.* - Liposomes produced by microfluidics and extrusion: A comparison for scale-up purposes. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. ISSN 15499642. 18 (2019) 146–156.
37. JAHN, Andreas *et al.* - Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. **Langmuir**. ISSN 07437463. 23:11 (2007) 6289–6293.
38. BALBINO, Tiago A. *et al.* - Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**. ISSN 13858947. 226 (2013) 423–433.
39. SEDIGHI, Mahsa *et al.* - Rapid optimization of liposome characteristics using a combined microfluidics and design-of-experiment approach. **Drug Delivery and Translational Research**. ISSN 21903948. 9:1 (2019) 404–413.