



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristina Alves Vilar

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização de Substâncias Neuroquímicas *In Vivo* no Cérebro por Microdiálise” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Daniel Ribeiro, do Dr. Paulo Monteiro e do Professor Doutor Rui M. Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Cristina Alves Vilar

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização de Substâncias Neuroquímicas *In Vivo* no Cérebro por Microdiálise” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação do Dr. Daniel Ribeiro, do Dr. Paulo Monteiro e do Professor Doutor Rui M. Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2022

Eu, Cristina Alves Vilar, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015251302, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Monitorização de Substâncias Neuroquímicas *In Vivo* no Cérebro por Microdiálise “apresentado 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, 5 de setembro de 2022.

Cristina Alves Vilar

(Cristina Alves Vilar)

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Rui M. Barbosa, pela disponibilidade e amabilidade que sempre demonstrou no decurso da realização desta monografia. O Professor foi o motor para a minha resiliência durante este semestre tão difícil.

Ao Dr. Daniel Ribeiro e a toda a equipa da Pharmilab, pela ajuda e acompanhamento durante estágio e por me motivarem sempre a ir mais longe. Um enorme obrigada.

Ao Dr. Paulo Monteiro e à equipa da Farmácia São José, por todo o carinho, paciência e preocupação. Obrigada por me ajudarem a ganhar confiança e espírito crítico, características muito úteis para a próxima etapa.

Aos meus amigos, os de cá e os de lá, por todo o apoio que me deram, por todos os bons momentos que passamos e histórias que partilhamos. Desejo a todos votos dos maiores sucessos nos vossos respetivos percursos.

À minha mãe, ao meu pai, à minha avó e à Margarida, por serem a pedra basilar de toda a estrutura que hoje eu sou. Pela educação que me deram, é a maior herança que levo de vós. Pelo orgulho que sempre demonstraram, vocês são a minha melhor claque. Por serem o meu porto de abrigo quando as coisas corriam menos bem. Por acreditarem sempre em mim.

Ao Diogo, o meu fiel companheiro nesta aventura pela Coimbra dos amores. Por teres sido o meu maior apoio neste capítulo que agora se encerra. E, neste virar de página, sei que celebraremos muitas vitórias juntos e sei que nenhuma tempestade será maior que nós. O próximo capítulo aguarda-nos.

A todos os que não mencionei, mas que, de uma maneira ou de outra, foram importantes para o meu percurso.

A Coimbra, cidade que há sete anos me acolheu e que será sempre a minha casa. Hoje vou embora, mas parte de mim fica contigo. E parte de ti levarei sempre no meu coração.

E ao meu avô, a quem eu dedico este documento. Coimbra tem, de facto, mais encanto na hora da despedida.

A todos, o meu mais eterno obrigada.

Índice

PARTE A: Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas	7
Introdução	8
Apresentação do local do estágio	9
Análise SWOT	9
1. Forças	10
2. Fraquezas	14
3. Oportunidades	15
4. Ameaças	16
Considerações Finais	16
Anexo	17

PARTE B: Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas	19
Introdução	20
Apresentação do local do estágio	20
Análise SWOT	21
1. Forças	21
2. Fraquezas	24
3. Oportunidades	24
4. Ameaças	25
Casos Clínicos	26
Considerações Finais	29

PARTE C: Monografia “Monitorização de Substâncias Neuroquímicas *In Vivo* no Cérebro por Microdiálise”

Abreviaturas	31
Resumo	32
Abstract	33
Capítulo I: Monitorização <i>in vivo</i> de substâncias neuroquímicas	34
Função Cerebral	34
Importância da deteção e quantificação <i>in vivo</i> de substâncias neuroquímicas	35
Técnicas de deteção <i>in vivo</i> existentes	37
Capítulo II: Microdiálise cerebral	39
Perspetiva histórica	39
Fundamento do método	40

Considerações importantes na amostragem por microdiálise.....	42
A. Tipo de analito.....	43
B. Sondas de microdiálise.....	43
C. Colheita e análise do dialisado.....	44
D. Implante da sonda e resposta tecidual.....	45
Recuperação e calibração das sondas.....	45
Capítulo III: Métodos analíticos para detecção e quantificação dos dialisados	47
Métodos analíticos não-separativos.....	48
A. Sensores e biossensores	48
B. Espectrometria de massa	49
C. Ensaio imunoenzimático	49
Métodos analíticos separativos.....	50
A. Cromatografia líquida de elevada pressão ou eficiência (HPLC).....	50
B. Cromatografia líquida capilar (cLC).....	51
C. Eletroforese capilar	52
Conclusão.....	54
Referências Bibliográficas	56

PARTE A

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Pharmilab



Estágio orientado pelo Dr. Daniel Ribeiro

Abreviaturas

AC	Autoridade Competente
ANF	Associação Nacional de Farmácias
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
CIAV	Centro de Informação Antivenenos
CNP	Código Nacional do Produto
CPNP	Portal de Notificação de Produtos Cosméticos
DGAV	Direção-Geral de Alimentação e Veterinária
DGS	Direção-Geral De Saúde
DRE	Diário da República Eletrónico
EFSA	Autoridade Europeia Segurança Alimentar
EM	Estado-Membro
EMA	Agência Europeia do Medicamento
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde
IPN	Instituto Pedro Nunes
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IT	Instrução de Trabalho
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
PC	Produtos Cosméticos
SA	Suplementos Alimentares
SDS	<i>Safety Data Sheet</i> (Ficha de Dados de Segurança)
SGQ	Sistema de Gestão de Qualidade
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>

Introdução

De acordo com o Decreto-Lei n.º 288/2001 de 10 de novembro, o Farmacêutico é um profissional de saúde altamente qualificado que, para além de executar todas as tarefas que ao medicamento dizem respeito, executa tarefas de natureza suscetível de contribuir para a salvaguarda da saúde pública.

Durante o Mestrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) são dadas a conhecer aos alunos as várias possibilidades profissionais inerentes à atividade farmacêutica. De facto, a faculdade reveste-nos de conhecimentos nas mais diversas áreas de competências, demonstrando que o Farmacêutico, sendo o especialista do medicamento é também agente de saúde pública e, como tal, relaciona-se com outras áreas que não as diretamente ligadas ao medicamento. O Farmacêutico é, portanto, um profissional muito versátil e dinâmico, apresentando um papel fulcral em muitas atividades e setores da sociedade, sendo um deles a Área Regulamentar da Indústria Farmacêutica de produtos de saúde.

Assim, foi com muita curiosidade e expectativa que escolhi a Pharmilab como local para realizar o meu estágio curricular. A Pharmilab é uma empresa de consultoria regulamentar e serviços laboratoriais na área da indústria cosmética, de suplementos alimentares, de dispositivos médicos e de biocidas, posicionada no mercado nacional e internacional.

Trabalhar numa empresa de consultoria regulamentar permitiu-me contactar com um setor diferente da atividade farmacêutica, tendo a oportunidade de, não só aplicar conhecimentos adquiridos ao longo do MICF, como também de adquirir novos conhecimentos e competências, em especial conhecimentos respeitantes à área regulamentar.

Durante o estágio, trabalhei unicamente no setor regulamentar, em particular na área dos suplementos alimentares e dos produtos cosméticos.

No presente relatório será realizada uma apreciação crítica relativamente ao estágio efetuado na Pharmilab, segundo o modelo SWOT. Este modelo de análise identifica aspetos positivos e negativos em duas dimensões – a dimensão interna e dimensão externa.

Apresentação do local do estágio

Integrada no IPN e com apenas 10 anos, a Pharmilab é uma empresa de consultoria especializada em assuntos regulamentares e ensaios laboratoriais orientados para a indústria de cosméticos, suplementos alimentares, biocidas e dispositivos médicos, estando posicionada nacional e internacionalmente. Na área regulamentar, a Pharmilab apresenta serviços como a revisão de formulações, Relatórios de Segurança, Revisão da rotulagem e alegações, *Product Information File* e notificação ao CPNP. Na área laboratorial, apresenta, ainda, serviços como *Challenge Test*, estudos de estabilidade, estudos de eficácia e estudos de segurança.

Análise SWOT

De forma a realizar uma apreciação crítica e a melhor descrever o estágio curricular na Pharmilab, a análise será feita segundo o modelo SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Este modelo de análise identifica aspetos positivos e negativos em duas dimensões – a dimensão interna e dimensão externa.

Tabela I: Análise SWOT do estágio na Pharmilab.

	Pontos Positivos	Pontos Negativos
Análise Interna	I. FORÇAS <ul style="list-style-type: none">a) Integração na equipa Pharmilab;b) Desenvolvimento de competências;c) Elaboração de um Guia Interno e de uma Instrução de Trabalho para a notificação de suplementos alimentares;d) Diversificação de tarefas;e) Contacto com autoridades competentes.	2. FRAQUEZAS <ul style="list-style-type: none">a) Ausência de planificação do estágio;b) Pouco contacto com o processo de notificação de produtos cosméticos.
Análise Externa	3. OPORTUNIDADES <ul style="list-style-type: none">a) Expansão da área dos suplementos alimentares e consolidação dos serviços de consultoria oferecida para estes produtos;b) Aumento da exigência regulamentar e importância do farmacêutico.	4. AMEAÇAS <ul style="list-style-type: none">a) Pouco contacto com a área no plano do MICEF;b) Profissionais de outras áreas científicas.

I. Forças

Integração na equipa Pharmilab

Um ponto muito positivo do estágio na Pharmilab foi a minha integração na empresa. Desde o início fui muito bem recebida na equipa não havendo, em algum momento, o sentimento de não-pertença. Fui muitas vezes incluída em reuniões e desde sempre houve um grande respeito pela minha opinião e pelo meu trabalho, demonstrando uma grande aceitabilidade e reconhecimento dos estagiários vindos do MICF.

A equipa, tanto da área regulamentar como do laboratório, é uma equipa jovem e muitos dos colaboradores são antigos estudantes da FFUC, pelo que a partilha de um mesmo *background* facilitou a boa comunicação e o espírito de entreaajuda, tão característico da nossa faculdade.

De facto, a Pharmilab possui um ambiente de trabalho muito saudável e um dinamismo muito próprio e, sendo este um dos meus primeiros contactos com o mercado de trabalho, fiquei imensamente satisfeita e muito entusiasmada para enfrentar os próximos desafios.

Desenvolvimento de competências

A área regulamentar, sendo a interface entre a atividade farmacêutica e o Direito, apresenta atividades de uma natureza muito heterogénea. Para um determinado produto estar conforme a regulamentação, é necessário que todos os aspetos que lhe são inerentes sejam controlados e verificados. Assim, a atividade de consultoria acompanha todo o percurso e longevidade de um determinado produto a pedido de um cliente, desde a sua formulação até a chegada às prateleiras.

Dada a grande diversidade de produtos, ingredientes, formulações, métodos de fabrico, entre outros, as áreas de conhecimentos são as mais diversas, como assuntos regulamentares, cosmetologia, galénica, farmacognosia, química, toxicologia, fisiologia, métodos instrumentais de análise e garantia e gestão de qualidade.

Como tal, tive a oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos ao longo do MICF e também de adquirir conhecimentos novos, em especial na área do empreendedorismo e do setor empresarial.

Uma vez que o meu estágio incidia na área regulamentar, todas as tarefas desenvolvidas exigiam a consulta de regulamentos europeus, decretos-leis e normas nacionais, pareceres e *guidelines* das autoridades competentes e comités científicos, pelo que foi necessário recorrer a sites oficiais como o EudraLex, o DRE, o portal DGS, o site do INFARMED, o portal da

DGAV, portal da EMA e o portal da EFSA. No final do estágio já possuía um nível de confiança e destreza com a pesquisa por estes portais e interpretação deste tipo de documentos.

Dado que muitos dos textos são publicados em inglês, foi uma oportunidade de consolidar os meus conhecimentos em inglês, especialmente inglês técnico. Para além das capacidades linguísticas adquiridas, também foi uma ótima oportunidade para aprofundar os meus conhecimentos informáticos, melhorando muito as minhas aptidões com o *Word* e com o *Excel*, que se provam ferramentas valiosíssimas nos dias de hoje.

Ao longo da minha pesquisa, tive de consultar artigos científicos, pelo que melhorei muito as minhas capacidades de procura por informação e, acima de tudo, a capacidade de perceber quando se tratava de informação sustentada por evidência ou ao contrário. Para isso, utilizei várias plataformas e bases de dados como PubMed®, Infomed®, PubChem®, entre outros.

Guia Interno Pharmilab e da Instrução de Trabalho

Quando iniciei o estágio, a Pharmilab tinha como interesse a expansão da área regulamentar dos suplementos alimentares. Assim, foi-me incumbida a tarefa de pesquisa e desenvolvimento de aspetos relacionados com SA, com o intuito de elaborar uma IT, de forma a simplificar e a normalizar o processo de notificação de suplementos alimentares às autoridades competentes (AC).

Ao longo da minha pesquisa, reuni muita informação à cerca dos SA, pelo que me propus a elaborar um Guia Interno para a empresa com todas essas informações bem como a bibliografia consultada.

Quando um cliente solicita um serviço de consultoria regulamentar para a notificação de um SA, a Pharmilab inicia um processo de avaliação da rotulagem e das especificações do produto e, posteriormente, de reunião da documentação necessária para enviar às AC. O fluxograma encontrado em anexo, é respeitante a este processo, pertencendo à IT de notificação de suplementos alimentares elaborada.

A regulamentação europeia dos SA encontra-se apenas parcialmente harmonizada, assim, é muito importante perceber certos aspetos relativos a este tipo de produtos. Uma questão fundamental é entender a fronteira medicamento-suplemento alimentar.

O SA, do ponto de vista regulamentar é categorizado como género alimentício, no entanto, podem conter certas substâncias que também podem ser encontradas em

medicamentos. Assim, numa primeira etapa do processo é necessário fazer o enquadramento do produto.

Outro aspeto importante é perceber se os ingredientes que compõem os SA são permitidos e em que quantidades estes podem estar presentes. A nível europeu, apenas está harmonizada a legislação para vitaminas e minerais, através do Regulamento (CE) n.º 1170/2009 da Comissão, de 30 de novembro de 2009, sendo que para outras substâncias, como aminoácidos, enzimas, pré e probióticos, substâncias bioativas e extratos de plantas, sendo matéria não harmonizada, devem ser consultadas as disposições nacionais do EM no qual se pretende colocar o SA. No que toca a aditivos e novos alimentos, devem ser consultadas as bases de dados criadas pela Comissão Europeia (*Food Additives EU list* e *Novel Food Catalogue*, respetivamente) para averiguar se estes ingredientes são permitidos.

Relativamente à rotulagem, devem ser incluídas no rótulo as menções obrigatórias como definido pelo Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de outubro de 2011. As alegações nutricionais e de saúde devem também ser avaliadas, uma vez que se trata informação voluntária incluída pelo operador económico, e que só podem ser utilizadas caso o produto preencha uma série de condições estabelecidas pelo Regulamento (UE) n.º 1924/2006 de 20 de dezembro.

Para perceber se uma alegação de saúde relativamente a uma substância é permitida, deve ser consultado o Anexo do Regulamento (UE) n.º 432/2012 da Comissão de 16 de maio de 2012, onde constam as alegações de saúde permitidas.

A elaboração do Guia Interno foi um trabalho muito enriquecedor pois, para além de ficar claro para mim todas as questões que envolvem os suplementos alimentares, consegui ver na prática como a pesquisa científica é integrada no setor empresarial.

Realizar a IT também foi muito vantajoso pois, sendo um documento fulcral no SGQ permitiu aplicar os conhecimentos adquiridos no MICF, em Gestão e Garantia de Qualidade, e permitiu observar na prática a adoção das normas ISO NP 9001:2015.

Tarefas muito diversificadas

Para além da pesquisa realizada para a preparação do Guia interno e da IT, pude também perceber como são feitos os contactos com os clientes da Pharmilab que pretendam colocar SA no mercado, pondo em prática toda a pesquisa feita até então. Assim, avalei se a rotulagem e a composição dos SA estavam de acordo com a legislação, através dos dados

enviados pelo cliente (fichas técnicas e *mock-up* da cartonagem), preenchi Tabelas de Notificação e reuni a documentação necessária para enviar à DGAV.

Também realizei tarefas relacionadas com outros produtos de saúde, em especial com produtos cosméticos (PC). Foi-me pedido que organizasse documentação para registo de vários PC, elaboração de fichas técnicas, verificação das fichas de dados de segurança (SDS) do produto e organização da documentação dos produtos notificados para atualização do registo interno da Pharmilab.

Este primeiro contacto com a documentação permitiu-me perceber as exigências regulamentares impostas ao mercado da cosmética, em particular pelo Regulamento (CE) n.º 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009, que serve de pilar para a preparação de toda a documentação técnica dos PC.

Contacto com as autoridades competentes

Ao longo do desenvolvimento do trabalho de pesquisa pela regulamentação para elaboração do Guia Interno e da Instrução de Trabalho para notificação de suplementos alimentares, foram surgindo questões que exigiram comunicação com as autoridades competentes.

A DGAV é a autoridade competente responsável pela definição, execução e avaliação das políticas de segurança alimentar, de proteção animal e de sanidade animal, proteção vegetal e fitossanidade, possuindo, entre outras, as funções de Autoridade responsável pela gestão do Sistema de Segurança dos Alimentos, e como tal é à DGAV que devem ser notificados os SA antes de serem colocados no mercado nacional.

Os SA devem, também, ser notificados ao CIAV, que retém as informações respeitantes à composição do produto para agilizar a resposta médica em casos de exposições e intoxicações.

Também pode ser do interesse do cliente que o seu SA seja comercializado em farmácias e, para tal, é obrigatório que seja feito um pedido do CNP à ANF. Quando um SA é notificado à DGAV, este não é sujeito a um processo de avaliação de qualidade e segurança, sendo que a DGAV apenas é responsável por avaliar o cumprimento da legislação, e não pela emissão de autorizações.

No caso particular dos SA vendidos em farmácias portuguesas é obrigatória uma análise técnica e científica da composição e rotulagem antes da atribuição do CNP. Assim, a

ANF pretende assegurar que os produtos comercializados nas farmácias portuguesas cumprem com todas as normas em vigor e que os produtos vendidos em farmácias mantenham um nível elevado de qualidade e segurança.

Já à ASAE compete a fiscalização dos produtos comercializados, incluindo os suplementos alimentares, sendo esta responsável pela retirada do mercado de produtos que não reúnam as condições dispostas nos Regulamentos e Decretos-Lei.

O contacto com estas AC, para além clarificar o processo de notificação de SA, como exposto no diagrama de processos incluído em anexo, permitiu clarificar o propósito e funções de cada AC, bem como a distribuição de responsabilidades entre elas.

2. Fraquezas

Ausência de planificação do estágio

Um dos pontos menos positivos e, provavelmente, o que mais condicionou a minha aprendizagem nestes três meses na Pharmilab foi a ausência de um plano de estágio que estabelecesse o propósito das tarefas que iria desempenhar e, de certa forma, aquilo que de mim era esperado. A falta de delineamento do trabalho, levou a que, muitas vezes, executasse tarefas sem perceber qual o seu objetivo ou qual o nível de organização e rigor que estas exigiam.

Mas se, por um lado, a falta de estruturação de um plano de estágio causou alguma desorientação inicial, por outro lado ajudou a desenvolver a minha autonomia, obrigando a que fosse eu própria a organizar o meu trabalho e a estabelecer prazos e níveis de exigência. Assim, a cada tarefa executada, foi possível aprender a resolver as questões que iam aparecendo e a solucionar problemas, ao meu próprio ritmo.

Pouco contacto com a notificação de produtos cosméticos

Embora tenha trabalho com a documentação necessária para o registo de produtos cosméticos no mercado europeu, não me envolvi diretamente com o processo de notificação. Para a notificação de um PC, antes de este ser colocado no mercado, a pessoa responsável deve notificar o seu PC no Portal de Notificação de Produtos Cosméticos (CPNP).

O CPNP trata-se de um portal europeu centralizado para a notificação de PC, e que detém todas as informações à cerca dos produtos comercializados, de forma a facilitar o acesso das AC e Centros Antivenenos de cada estado-membro a informações úteis para

efeitos de fiscalização, análise do mercado e informação ao consumidor e para efeitos de tratamento médico de exposições e intoxicações por PC, respetivamente.

Assim, um dos pontos fracos do meu estágio foi a falta de oportunidade de trabalhar ou observar o processo de notificação no CPNP, o que permitiria a contextualização de todo o trabalho realizado de organização e elaboração da documentação.

3. Oportunidades

Expansão da área dos suplementos alimentares

Como já referido anteriormente, muito do meu trabalho na Pharmilab consistiu na pesquisa e consolidação de conhecimentos relativos a suplementos alimentares e ao processo de notificação dos mesmos, pois a empresa tinha como intuito expandir os serviços de consultoria oferecida para estes produtos que até ao momento, consistia numa pequena carteira de clientes. Uma vez que adquiri muitas competências relativamente a SA, o meu orientador começou a confiar-me tarefas de maior envolvimento com clientes.

Tudo isto deu-me a clareza para perceber que, embora não seja recente, a área dos SA pode oferecer novas oportunidades de emprego, tanto na Pharmilab como noutras empresas consultoras, especialmente com o crescente aumento do interesse por este tipo de produtos pelo consumidor comum.

O farmacêutico e o aumento da exigência regulamentar

O mercado de produtos cosméticos, dispositivos médicos, biocidas e suplementos alimentares tem crescido em tamanho, valor, mas também em exigência. Com o passar dos tempos têm surgido novos regulamentos com normas cada vez mais apertados para que chegue ao consumidor final produtos de grande eficácia e segurança.

O constante aumento da exigência regulamentar cria a necessidade de empregar trabalhadores mais especializados em Assuntos Regulamentares como, e dada a sua formação académica, o farmacêutico.

4. Ameaças

Pouco contacto com a área no plano do MICF

Embora o plano curricular do MICF seja muito abrangente, houve pouco contacto com a área regulamentar, em especial com os assuntos regulamentares dos cosméticos, dispositivos médicos e suplementos alimentares, sendo apenas referidos, muito brevemente, em diversas unidades curriculares. Estes conhecimentos seriam muito importantes para a realização deste estágio.

Profissionais de outras áreas científicas

Pelo que pude observar durante o meu estágio na Pharmilab verifiquei que esta área de Assuntos Regulamentares dá acesso à empregabilidade de outros profissionais que não farmacêuticos. Embora seja necessária uma equipa multidisciplinar, que trabalhe em conjunto e aplique conhecimentos de diferentes vertentes científicas, é importante que o farmacêutico seja a primeira escolha e, portanto, é preciso um reforço do plano curricular do MICF para que prepare futuros profissionais capazes de ocupar estes lugares.

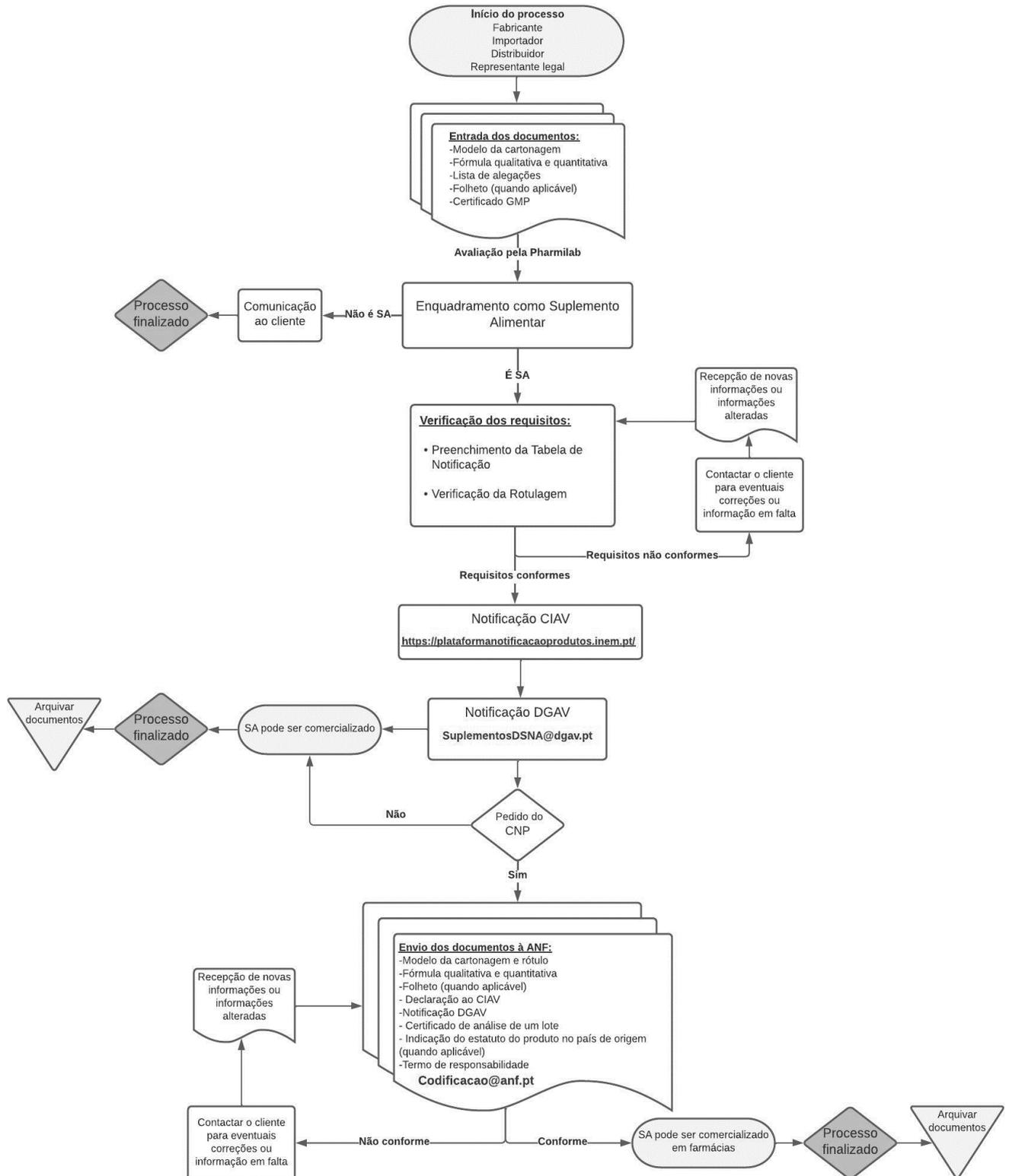
Considerações Finais

Estando o meu percurso académico na reta final, procuro incessantemente perceber quais as portas que se poderão abrir no futuro. Este estágio foi muito gratificante, na medida que conheci de perto os desafios e oportunidades que a área dos Assuntos Regulamentares oferece ao Farmacêutico, e em especial, assuntos regulamentares relacionados com produtos de saúde que não o medicamento.

Estes três meses de estágio na Pharmilab foram muito enriquecedores permitindo perceber que o farmacêutico é um profissional muito versátil e que, mesmo em território desconhecido, como é o caso da área do Direito, é capaz de estar à altura dos desafios.

A minha passagem pela Pharmilab acrescentou muito ao meu percurso académico, motivando-me a ser uma profissional competente e ambiciosa.

Anexo – Fluxograma do processo de notificação de suplementos alimentares.



PARTE B

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia São José



Estágio orientado pelo Dr. Paulo Monteiro

Abreviaturas

CHUC	Centro Hospitalar Universitário de Coimbra
DCI	Denominação Comum Internacional
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FSJ	Farmácia São José
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
MNSRM-EF	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica Exclusivo Farmácia
MSRM	Medicamento Sujeito a Receita Médica
MUV	Medicamentos de Uso Veterinário
OF	Ordem dos Farmacêuticos
PIM	Preparação Individualizada da Medicação
PVP	Preço de Venda Público
SINAVE	Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica
SNS	Serviço Nacional de Saúde
SWOT	<i>Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats</i>
TRAg	Teste Rápido de Antigénio

Introdução

Foi nesta etapa final do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas que verifiquei que, para além dos conhecimentos teóricos, é necessária uma boa capacidade de adaptação e de resolução de problemas imediatos da prática profissional. Assim, considero de extremíssimo valor a inclusão no plano de estudos de MICF do estágio curricular em Farmácia Comunitária., uma vez que é neste estágio que se estabelece o primeiro contacto com o utente em casos clínicos reais.

Ficou também claro para mim, ao longo do estágio, a real importância da farmácia na comunidade. É à farmácia que os utentes primeiro recorrem quando necessitam de ajuda relativamente à sua saúde, tornando a farmácia o primeiro contacto do utente com os cuidados de saúde e o farmacêutico o profissional de saúde na linha da frente, fazendo sobressair o verdadeiro significado de ser farmacêutico: uma articulação entre especialista do medicamento e um agente de saúde pública.

Desta forma, o estágio concede uma oportunidade única ao estudante de consolidação de conhecimentos já adquiridos, como também de aquisição de novas aprendizagens, antes de entrar no mundo profissional.

Apresentação do local do estágio

A Farmácia São José, localizada no Centro Comercial Primavera, na Avenida Calouste Gulbenkian, foi fundada em 1950 nos Arcos do Jardim e trespassada a Dra. Maria Prazeres Monteiro em 1957, sendo transferida de local, para a sua localização atual. Em 1997, a direção técnica foi assumida pelo Dr. Paulo Monteiro, mantendo-se até ao presente. Ao longo dos tempos, a FSJ veio a sofrer inúmeras remodelações, porém a confiança e fidelidade dos seus utentes manteve-se, contando com fidelizações de décadas em alguns casos, provando a qualidade dos serviços fornecidos pela farmácia.

A apreciação positiva que faço deste estágio, em muito se deveu à equipa técnica da FSJ, que demonstrou enorme profissionalismo e espírito de entajuda entre todos os seus elementos e que integrou muito bem os seus estagiários, auxiliando-os sempre, e pacientemente, em todas as tarefas que estes realizassem.

Análise SWOT

O presente relatório faz uma análise crítica, na forma de análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), permitindo sistematizar os pontos fortes e fracos de uma perspetiva interna, bem como esclarecer as oportunidades e ameaças encontradas pela análise externa do estágio realizado no período de 11 de abril a 29 de julho.

Tabela II: Análise SWOT do estágio na Farmácia São José.

	Pontos Positivos	Pontos Negativos
Análise Interna	I. FORÇAS a) Equipa, localização e horário de funcionamento; b) Preparação de medicamentos manipulados; c) Preparação individualizada da medicação; d) Organização e gestão das estratégias de marketing e da farmácia; e) Realização de atendimentos desde o início do estágio.	2. FRAQUEZAS a) Associação dos nomes comerciais dos medicamentos com os princípios ativos b) Aconselhamento sobre dispositivos médicos, homeopatia e MUV.
Análise Externa	3. OPORTUNIDADES a) Pandemia: Realização de testes rápidos de antígeno SARS-COV-2 b) Prestação de serviços complementares c) Plano curricular do MICF	4. AMEAÇAS a) Medicamento genérico da perspetiva do utente b) Relação utente-estagiário c) Automedicação

I. Forças

Equipa, localização e horário de funcionamento

A farmácia São José é composta por uma equipa multidisciplinar de farmacêuticos, técnicos de farmácia e ajudantes de farmacêutico, sendo que a cada profissional estão incumbidas funções distintas e de acordo com a formação de cada um, contribuindo desta forma para uma equipa dinâmica e grande especialização.

A localização da FSJ é ideal pela sua localização no centro de Celas, com uma densidade populacional considerável, e pela proximidade ao CHUC, centros de saúde, clínicas e consultórios médicos. Como tal, os utentes das mais variadas faixas etárias têm acesso facilitado à farmácia e, com um horário de funcionamento flexível, com abertura das 8h30 às 21h de segunda a sexta e ao sábado das 9h às 20h, permite que a FSJ seja uma farmácia de eleição para os utentes. Este facto também é muito útil para a aprendizagem dos estagiários, uma vez que permite que estes tenham maior flexibilidade de horário e que contactem com diferentes utentes e ritmos de trabalho ao longo do estágio.

Preparação de medicamentos manipulados

Embora a prescrição de medicamentos manipulados esteja a cair em desuso, ainda afluem à farmácia utentes que necessitam da preparação de medicamentos por não existirem no mercado ainda preparação que satisfaçam as suas necessidades. Isto é mais proeminente em medicamentos de aplicação tópica e em preparações para a população pediátrica. A FSJ possui um laboratório devidamente equipado e preparado para o efeito e possui também um software para a gestão da preparação do manipulado – o *SoftGaleno*[®], de acordo com os procedimentos descritos na Farmacopeia Portuguesa IX e cumprindo as boas práticas de preparação de medicamentos manipulados.

Assim, durante o meu estágio tive a oportunidade de assistir e auxiliar na preparação de alguns medicamentos manipulados, em especial a preparação de cápsulas de minoxidil e de uma suspensão oral de captopril, pondo em prática os conhecimentos adquiridos no MICEF, particularmente nas disciplinas de Farmácia Galénica e das Tecnologias Farmacêuticas.

Preparação Individualizada da medicação

A FSJ também executa a preparação individualizada de medicação (PIM) tanto para instituições que não possuem serviços farmacêuticos próprios como para utentes que, quer pela complexidade do seu regime terapêutico, quer pelas necessidades do próprio utente, necessitam de auxílio na gestão da sua medicação. A PIM recorre à utilização de caixas dispensadoras nas quais o farmacêutico organiza a medicação dos utentes de acordo com a posologia prescrita. A PIM permite, assim, auxiliar uma correta administração dos medicamentos e promover uma maior adesão à terapêutica. Durante o estágio tive oportunidade de assistir à elaboração de PIM pelo farmacêutico responsável, podendo observar na prática os conhecimentos já adquiridos durante o MICEF, em particular as matérias estudadas na unidade curricular de Farmácia Clínica e Farmacoterapia.

Organização e gestão da farmácia e das estratégias de marketing

As atividades de uma farmácia, sendo a primordial o aconselhamento farmacêutico e dispensa de medicamentos, são as mais diversas e de igual responsabilidade. Assim, é importante que toda a equipa conheça quais as tarefas que devem ser desempenhadas para a otimização de recursos e melhor funcionamento da farmácia. Como tal, tive oportunidade de realizar esse tipo de tarefas, fulcrais para a organização e gestão de *stocks* da farmácia.

Relativamente às encomendas, estas são feitas quer por compra diária, através do Sifarma2000[®] que assegura o *stock* mínimo e máximo de cada produto; quer por telefone com os laboratórios ou armazenistas; ou por contacto pessoal com o delegado de saúde. As encomendas têm em conta uma análise prévia das saídas dos produtos nos meses anteriores ou da sazonalidade destes, de forma que sejam feitas compras de forma racional. A receção de encomendas e o armazenamento dos produtos era realizado segundo o princípio *first in first out* promovendo as saídas dos produtos por prazo de validade.

A gestão das validades também é de extrema importância, sendo realizadas periodicamente de forma a monitorizar os produtos com validades a expirar e a certificar que os produtos entregues aos utentes possuem um prazo de validade adequado assegurando a qualidade, eficácia e segurança dos mesmos.

Também participei por várias vezes na organização dos lineares e gondolas da farmácia permitindo-me perceber que a forma como os produtos estão expostos aos utentes tem uma importância vital para a saída destes e, portanto, para a gestão dos *stocks* da farmácia.

Realização de atendimentos desde o início do estágio

Já na primeira semana de estágio na Farmácia realizei o meu primeiro atendimento. Ter tido esta experiência numa fase tão inicial permitiu que perdesse o receio inerente da falta de experiência e de segurança, e permitiu desenvolver a minha confiança no contacto com os utentes bem como a possuir um papel mais ativo nos atendimentos ao longo do tempo. Denote-se que os atendimentos, inicialmente, eram realizados sempre com supervisão de um farmacêutico e apresentavam um nível de dificuldade adequado à minha experiência.

2. Fraquezas

Associação dos nomes comerciais com os princípios ativos

Durante o MICF os conteúdos abordados incidiram, essencialmente, nos princípios ativos que compõem os medicamentos, sendo estes raramente associados aos nomes comerciais. Desta forma, senti algumas dificuldades em fazer a associação entre o princípio ativo e a marca comercial, especialmente no início do estágio, tendo de recorrer ao auxílio de um elemento da equipa. Este facto dificultou o aconselhamento pois, se por um lado tornou o atendimento mais moroso, por outro era entendido pelo utente como falta de competência, pelo que gerava desconfiança naquilo que lhe era aconselhado.

Aconselhamento sobre dispositivos médicos, homeopatia e MUV

No início do estágio, encontrei-me perante uma grande variedade de produtos, alguns já do meu conhecimento, mas muitos outros inteiramente novos para mim. Ainda que o MICF nos proporcione uma formação de excelência com uma vasta aquisição de conhecimentos muito diversificados, senti que as matérias relativas aos produtos homeopáticos, dispositivos médicos e medicamentos de uso veterinário foram muito breves, gerando alguma insegurança no aconselhamento destes produtos ao utente.

Porém, o *Sifarma2000*[®] provou ser uma ferramenta muito útil, permitindo que consultasse os detalhes dos produtos a dispensar, ajudando-me bastante no aconselhamento. A equipa da FSJ também foi fundamental na minha aprendizagem, estando sempre pronta para me auxiliar nos aconselhamentos sempre que sentisse alguma dificuldade e respondendo a todas as minhas dúvidas.

3. Oportunidades

Realização de testes rápidos de antígeno SARS-COV-2

Os últimos dois anos provaram ser tempos de grande adaptação e de resiliência quer dos serviços de saúde, quer da população. As farmácias não foram exceção. A realização dos TRAg para vigilância clínica e isolamento ao domicílio foi fulcral para sobressair a posição das farmácias como parte fundamental dos serviços de saúde e realçar o papel do farmacêutico como profissional de saúde e agente de saúde pública.

Embora os testes só pudessem ser realizados por farmacêuticos com formação para tal, tive oportunidade de rececionar os utentes e de comunicar os resultados ao SINAVE, sendo muito esclarecedor para mim como a articulação entre as farmácias e o SNS é realizada.

Prestação de serviços complementares

Adicionalmente aos TRAg, a FSJ também dispõe de outros serviços complementares, como a medição de parâmetros bioquímicos, como a glicémia e o colesterol total, e da medição de parâmetros fisiológicos, como a pressão arterial, serviços que tive a possibilidade de realizar. A farmácia também dispõe de consultas semanais de nutrição realizadas por uma nutricionista, bem como de rastreios da pele e rastreios à microcirculação realizados por especialistas dos laboratórios das marcas com quais a farmácia trabalha. A FSJ também realiza administração de injetáveis e da administração das vacinas da gripe. Todos estes serviços, para além de reafirmar o papel da farmácia na comunidade, também reforçam o atendimento, permitindo exercer aconselhamentos de qualidade.

Plano curricular do MICF

A maior aprendizagem que retirei deste estágio é a excelência do plano curricular do MICF. De facto, o ensino na FFUC é muito enriquecedor, variado e de grande qualidade, facultando as bases necessárias para aplicar a teoria na prática profissional. Para lá da aplicação dos conhecimentos adquiridos, o MICF também fomenta o espírito crítico dos seus estudantes, capacitando-os para a resolução rápida e eficaz de problemas que surgem no quotidiano de uma farmácia.

4. Ameaças

Medicamento genérico da perspetiva utente

Embora os medicamentos genéricos já estejam bem estabelecidos no mercado português há vários anos, ainda subsiste alguma desconfiança do utente face à utilização destes medicamentos. Uma vez que a prescrição é feita por DCI, é da preferência do utente levar o medicamento genérico ou original. Assim, e quando confrontados com esta questão, os utentes, especialmente os mais velhos, apresentavam alguma desconfiança acerca da eficácia do medicamento genérico. É muito importante esclarecer a população sobre os medicamentos genéricos pois, não só facilitaria a comunicação entre o utente e o farmacêutico como também diminuiria os encargos financeiros não só do utente como também do SNS.

Relação utente-estagiário

Durante o estágio, foi notória a falta de recetividade dos estagiários pelos utentes, sendo que alguns utentes, particularmente os mais velhos, ficavam bastante apreensivos quando eram atendidos pelos estagiários. Alguns, ainda, esperavam para serem atendidos por outro colega, pois preferiam ser atendidos por profissionais de saúde com experiência ou pelos colegas que já conheciam e com quem já tinham confiança.

O “*natural é que é bom*” e automedicação

Numa sociedade cada vez mais informada e mais dependente das redes sociais e dos media, os utentes são diariamente atingidos com campanhas publicitárias de produtos farmacêuticos, em particular anúncios de MNSRM. Ora, isto impele os utentes a muitas vezes, recorrer à automedicação, pouco conscientes das consequências que poderão advir desta ação. Assim, era comum aparecerem utentes a solicitar determinados medicamentos que “*viram na televisão*” ou que “*apareceu num anúncio no Instagram*” pondo em causa um correto aconselhamento por parte do farmacêutico.

Outro comportamento muito comum dos utentes, e muito prevalente nos mais jovens, era questionarem sobre o quão natural era o medicamento ou se existiam alternativas mais naturais da terapêutica. Uma ideia errónea, mas que aparecia muitas vezes ao balcão era a substituição de um medicamento por um suplemento alimentar pois, na perspetiva do utente o suplemento é “*natural e, assim, melhor*” enquanto o medicamento é “*sintético e com muitos aditivos*”.

Casos Clínicos

Os casos inframencionados são alguns exemplos de situações que surgiram durante o meu estágio na Farmácia São José.

Caso I: Secura vaginal

Uma senhora de 55 anos solicita ao balcão *Gino-Canesten*[®] creme, pois tem apresentado dor e desconforto vaginal, vermelhidão e alguma comichão e acredita poder ser uma infeção. Após questionar a senhora se apresenta corrimento purulento, ao qual responde que não, verifico que se trata de um caso de secura vaginal, uma vez que não apresenta infeção, nem bacteriana, nem fúngica.

Intervenção farmacêutica: Desaconselhar o uso de *Gino-Canesten*[®] pois contém clotrimazol, um antifúngico utilizado para tratar infeções vaginais por *Candida albicans*. Como não se trata de uma infeção fúngica o seu uso é ineficaz.

A secura vaginal caracteriza-se pela diminuição da lubrificação natural da vagina podendo dever-se a muitos fatores, sendo o principal a diminuição dos níveis de estrogénio e é uma condição muito proeminente em idades pós-menopausa.

Aconselhar o uso de lubrificantes e hidratantes vaginais tais como o creme-gel *Isdin*[®] de forma a criar uma película protetora na parede vaginal. Aconselhar também a higiene íntima com gel íntimo com propriedades hidratantes, como a emulsão suave *Lactacyd*[®] enriquecida com óleos. Advertir para a evicção de sabões, perfumes e duches vaginais, que agravam a secura vaginal.

Caso II: Diarreia infantil

Uma mãe dirige-se à farmácia à procura de soluções para tratar o seu filho, um bebé de 4 meses, que tem apresentado diarreia frequente nos últimos dois dias. Refere que na semana anterior o bebé tomou a vacina para a gastroenterite viral e que crê a diarreia poderá ser efeito da vacina. Afirma, ainda, que tem vigiado a temperatura corporal e que não apresenta febre. Questionei a senhora sobre a alimentação do bebé, ao respondeu que ainda não tinha introduzido alimentos, mas o seu pediatra já tinha aconselhado a iniciar a introdução alimentar.

Intervenção farmacêutica: De forma a perceber se a diarreia se devia aos efeitos da vacinação ou a alguma intolerância alimentar, nomeadamente ao leite, aconselhei a iniciar a introdução alimentar. Aconselhei a começar pelas sopas, especialmente sopa de cenoura com batata e abóbora, e evitar o uso de gordura, como o azeite, pois pode agravar a diarreia.

Como medida farmacológica, aconselhei a toma de um probiótico para regular a flora intestinal, como as gotas *BioGaia*[®] e, para o restabelecer a hidratação e eletrólitos, aconselhei a toma da solução oral de reidratação *Electrolit*[®]. A nível de medidas não farmacológicas, referi a importância da ingestão de líquidos. Aconselhei, também, os pais a vigiar a temperatura do bebé pois, se apresentar febre, a diarreia poderá dever-se a outra patologia subjacente e, dado isto, terá de ser encaminhado para o médico.

Caso III: Suplementação alimentar

Um senhor, na casa dos 60 anos, dirigiu-se à farmácia com queixas de fraqueza muscular e prostração. Referiu que na semana anterior esteve em isolamento domiciliário pela infeção por COVID-19. Perguntou se haveria alguma coisa que poderia tomar para diminuir o cansaço.

Intervenção farmacêutica: Expliquei ao senhor que a fadiga muscular estaria associada à síndrome pós-Covid e que, na maioria dos casos, é autolimitada. Adverti o senhor para a importância da prática de exercício físico, ao seu próprio ritmo e de forma gradual, da ingestão abundante de água, do descanso adequado e de uma boa higiene do sono e à importância de uma alimentação saudável. Aconselhei, também, a toma de um suplemento alimentar com magnésio, como o *Magnesium-OK*[®], uma vez que este mineral desempenha um papel importante no funcionamento normal do sistema músculo-esquelético.

Caso IV: Automedicação

Uma jovem de 24 anos dirige-se à farmácia com sintomas de sinusite. Diz que tomou *Nasomet*[®] spray que tinha em casa, e que pertencia ao seu namorado, pois ele toma este medicamento quando tem crises de rinite alérgica. Afirma que depois da toma de *Nasomet*[®] a sua sinusite piorou.

Intervenção farmacêutica: Adverti a utente que o *Nasomet*[®] é um MSRM e como tal, só deve ser tomado quando há indicação médica. O furoato de mometasona é um corticosteroide descongestionante tópico, indicado para o alívio de sintomas associados à rinite alérgica. O agravamento dos sintomas de sinusite pode ter sido devido ao efeito *rebound* típico dos corticosteroides, quando é ultrapassada a dose ou o tempo de tratamento recomendados.

Aconselhei a utente a tomar um anti-inflamatório, como o *Spidifen*[®] que contém ibuprofeno 400 mg para diminuir a inflamação das mucosas dos seios perinasais. Aconselhei, também a toma de *Fluimucil*[®], cujo princípio ativo é a acetilcisteína, de forma a fluidificar as secreções nasais e facilitar a sua eliminação. Adverti para a importância para uma boa lavagem nasal diária, como o uso de uma água do mar, como o spray nasal *Rhinomer*[®].

Caso V: Dermocosmética

Um homem jovem de, aproximadamente, 20 anos, dirigiu-se à farmácia para levantar uma receita de isotretinoína oral. Referiu que era a primeira vez que iria tomar tal medicamento, prescrito pelo seu dermatologista para o tratamento da acne grave facial, e que procurava aconselhamento adicional.

Intervenção farmacêutica: Adverti o utente para o uso regular de um protetor solar com proteção elevada, pois a isotretinoína oral é muito fotossensibilizante. Aconselhei a lavagem regular do rosto com água morna e com um gel de limpeza seborregulador apropriado para pele oleosa e acneica, como o gel de limpeza Avène® Cleanance, e à utilização de um creme hidratante global, como creme Uriage® Hyséac 3-Regul Global.

Considerações Finais

Concluído o estágio na farmácia comunitária, é com firmeza que afirmo que este foi de enorme importância para a minha formação académica. De facto, esta experiência foi muito enriquecedora, permitindo aplicar os conhecimentos teóricos obtidos ao longo dos 5 anos do MICF e entender melhor como se processa o mercado profissional.

O estágio na FSJ foi, sem dúvida alguma, fulcral para o meu crescimento, não só a nível académico e profissional, mas, sobretudo, a nível pessoal, pois permitiu-me ultrapassar certos obstáculos, em especial com o atendimento ao público. Aprendi que uma boa comunicação, o respeito, a paciência e o saber ouvir são qualidades necessárias ao balcão e que tornam o farmacêutico uma profissão de extrema nobreza e focada no bem-estar dos utentes.

Terminada esta etapa, encaro o meu futuro como farmacêutica com muito ânimo e, graças ao estágio realizado, com mais segurança em mim própria, pois tive uma ótima preparação para exercer a profissão.

PARTE C

Monografia

“Monitorização de Substâncias Neuroquímicas *In Vivo* no Cérebro
por Microdiálise”



Orientada pelo Prof. Doutor Rui M. Barbosa

Abreviaturas

CE	Eletroforese capilar
cLC	Cromatografia líquida capilar
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i>
HPLC	Cromatografia líquida de elevada pressão ou eficiência
mAb	Anticorpos monoclonais
NNF	<i>No Net Flux</i>
PET	Tomografia de emissão de positrões
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RR	Recuperação Relativa
SNC	Sistema Nervoso Central

Resumo

O conhecimento sobre a função cerebral, a compreensão dos processos fisiológicos inerentes ao comportamento humano, o diagnóstico de fisiopatologias cerebrais e a monitorização da ação de xenobióticos no Sistema Nervoso Central, como fármacos e tóxicos, foi e tem sido do maior interesse das neurociências. O ambiente dinâmico do cérebro e a sua química complexa exigem a aplicação de métodos para a monitorização de substâncias neuroquímicas *in vivo* com uma elevada sensibilidade e resoluções temporal e espacial adequadas. Assim, a microdiálise cerebral surge como uma técnica de amostragem associada a métodos para a identificação e quantificação de substâncias endógenas e exógenas no espaço extracelular, tais como métodos cromatográficos, eletroforéticos e enzimáticos, que permitem melhorar a resolução temporal e a automatização desta técnica.

Esta monografia assume uma abordagem geral dos princípios metodológicos da amostragem por microdiálise bem como das técnicas passíveis de serem acopladas para a identificação e quantificação de analitos, sublinhando alguns aspetos práticos, as principais vantagens e os seus maiores inconvenientes e limitações.

Palavras-chave: Sistema Nervoso Central; substâncias neuroquímicas; microdiálise; recuperação de sondas; *No-Net-Flux*.

Abstract

The knowledge about brain function, the understanding of the physiological processes inherent to human behaviour, the diagnosis of cerebral physiopathology and the monitoring of xenobiotics action in the Central Nervous System, such as drugs and toxics have been of the greatest interest in the neurosciences. The dynamic environment of the brain and its complex chemistry demand the application of methods for *in vivo* monitoring of neurochemical substances with high sensitivity and adequate temporal and spatial resolutions. Thus, brain microdialysis emerges as a sampling technique of election, and the coupling of methods for the identification and quantification of endogenous and exogenous substances in the extracellular space, such as chromatographic, electrophoretic and enzymatic methods, allows to improve the temporal resolution and the automation of this technique.

This monograph takes a general approach of the methodological principles of microdialysis sampling as well as the techniques that can be coupled for the identification and quantification of analytes, highlighting some practical aspects, the main advantages and its greatest drawbacks.

Keywords: Central Nervous System; neurochemical substances; microdialysis; probe recovery; *No-Net-Flux*.

Capítulo I: Monitorização *in vivo* de substâncias neuroquímicas

Função Cerebral

O cérebro, sendo considerado um órgão anatómico de intricada complexidade, é ainda um grande mistério para a ciência biomédica, e a relação estrutura-função não está completamente estabelecida. Como tal, entender o funcionamento do cérebro bem como as fisiopatologias relacionadas com este órgão, é visto como um dos maiores desafios para a ciência, e o conhecimento obtido ao longo do tempo com a investigação e descobertas feitas neste campo manifesta-se como de extremo valor para as mais diversas aplicações.

O cérebro é composto por uma densa rede de neurónios, a unidade funcional do Sistema Nervoso, que comunicam entre si através das sinapses. Na fenda sináptica são libertados mensageiros químicos do terminal pré-sináptico e que interagem com os recetores localizados no terminal pós-sináptico. Estes mensageiros, designados por neurotransmissores, são pequenas moléculas sintetizadas e armazenadas em vesículas nas células neuronais. Os impulsos elétricos desencadeiam a neurotransmissão levando à fusão dessas vesículas na membrana do terminal pré-sináptico, libertando os neurotransmissores na fenda sináptica. Ao interagirem com os recetores específicos localizados na membrana do terminal pós-sináptico, os neurotransmissores entregam, assim, a mensagem química (Lama *et al.*, 2012).

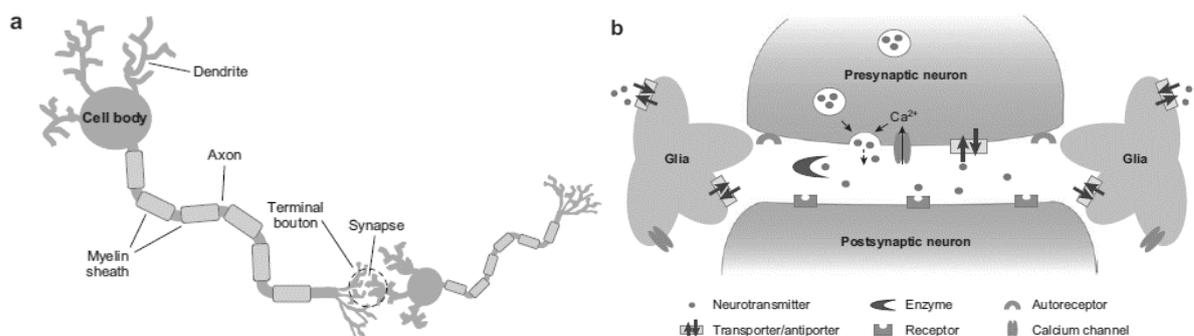


Fig. 1: Representação geral de uma sinapse. Adaptado de (Schultz e Kennedy, 2008).

Este fluxo de substâncias neuroquímicas de um neurónio para outro dá-se o nome de neurotransmissão, e é considerado um processo conectivo (“wired” neurotransmission), uma vez que cada neurónio apenas comunica com os neurónios que lhe estão especificamente ligados. Os neurónios também podem comunicar com outras células neuronais e da glia através da designada transmissão em volume (*volume neurotransmission*) libertando as substâncias neuroquímicas para o espaço extrasináptico (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

Estas duas formas de comunicação química numa rede neuronal complexa exibem, assim, uma elevada eficiência de comunicação e transmissão de informação num curto período de tempo, permitindo a integração de sinais que regulam toda a função cerebral desde o controlo de movimentos às emoções e pensamentos.

Os métodos bioanalíticos têm um papel importante na compreensão do funcionamento do cérebro, oferecendo ferramentas valiosas para a monitorização e quantificação das substâncias envolvidas na neurotransmissão e neuromodulação (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

Importância da deteção e quantificação *in vivo* de substâncias neuroquímicas

As técnicas de deteção e monitorização de neurotransmissores e neuromoduladores são de valor inestimável uma vez que permitem investigar a fisiopatologia das doenças neurodegenerativas e psicóticas, o estado e progressão de disfunções metabólicas cerebrais e novos alvos terapêuticos para psicofármacos. O modo como os fármacos de ação sistémica afetam regiões específicas do cérebro é de extrema utilidade no diagnóstico, nos cuidados intensivos, no desenvolvimento de novas terapêuticas e ensaios toxicológicos aplicados em variadas vertentes das ciências biomédicas (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

No desenvolvimento farmacêutico, os dados utilizados para a tomada de decisão são as concentrações plasmáticas do fármaco, no entanto, muitos eventos bioquímicos e farmacológicos ocorrem ao nível dos tecidos nos quais o fármaco exerce a sua ação, pelo que a quantificação deste diretamente no tecido em causa implica valores mais fidedignos e dados mais robustos (Chaurasia *et al.*, 2007). Isto torna-se especialmente vantajoso quando o tecido em causa é o cérebro, uma vez que a psicofarmacologia tem sido colocada de lado por muitas indústrias farmacêuticas pois implicam ensaios muito demorados, muito dispendiosos e que muitas vezes falham numa fase avançada dos estudos (Schulz, 2019).

Tome-se como exemplo a quantificação de anticorpos monoclonais (mAb) para o tratamento de distúrbios do SNC. Até à data não foram ainda aprovados anticorpos monoclonais que demonstrem eficácia suficiente no parênquima cerebral por administração sistémica (Chang *et al.*, 2018). Embora o local de ação do mAb seja o parênquima cerebral, a medição deste analito no fluido intersticial parenquimal é realizada muito raramente, optando-se pela quantificação da concentração no homogeneizado do cérebro como um todo nos estudos pré-clínicos, ou da concentração no fluido intersticial colhido por punção lombar nos estudos clínicos. Desta forma, não há distinção entre as farmacocinéticas dos mAb nas

diferentes regiões do cérebro. Assim, o desenvolvimento de métodos que meçam diretamente a concentração de analitos no local de ação é, inquestionavelmente, de grande valor.

Estes métodos são, também, muito úteis uma vez que permitem que o controlo e o teste sejam feitos em apenas um animal ao contrário da medição da concentração do analito em tecidos, que requerem um animal para cada concentração e ainda animais controlo, reduzindo, assim, em 10 vezes o número de animais nos ensaios (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

Os métodos de quantificação e deteção *in vivo* de substâncias neuroquímicas são relevantes nos cuidados intensivos para o acompanhamento da disfunção do metabolismo cerebral em pacientes com lesão cerebral aguda, como traumas cerebroencefálicos (TCE), acidentes vasculares cerebrais isquémicos (AVC) e hemorragias intracranianas que potenciem a indução de cascatas pró-inflamatórias de citocinas que alteram a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Os dados recolhidos de culturas celulares e modelos de tecidos de animais e humanos sugerem que estados distintos de disfunção metabólica podem ser observados através da quantificação de metabolitos como, por exemplo, a razão piruvato/lactato, a concentração de glucose e o nível de oxigenação tecidual ($PbtO_2$) e, portanto, a monitorização dos seus valores *in vivo* no fluido extracelular cerebral de forma contínua nestes pacientes permite avaliar o prognóstico e a resposta ao tratamento de forma eficaz (Guilfoyle *et al.*, 2021).

As técnicas *in vivo* podem, ainda, ser utilizadas no diagnóstico de doenças neurodegenerativas, uma vez que quantificam os neurotransmissores envolvidos nas respostas neurológicas a estímulos internos e externos. Estudos anteriores sugerem que certas doenças neurológicas, como a esquizofrenia, por exemplo, são determinadas pela disfunção da neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica, glutamatérgica e GABAérgica, induzindo os sintomas positivos, sintomas negativos e disfunção cognitiva que definem a fisiopatologia da doença (Nagai *et al.*, 2010). A quantificação destes neurotransmissores no córtex e hipocampo cerebral permite não só compreender os mecanismos patológicos de doenças e distúrbios cerebrais, mas também proceder ao seu diagnóstico.

No campo da neurotoxicologia tem-se verificado avanços significativos nas últimas décadas devendo-se em muito a métodos de deteção e quantificação *in vivo* de neurotóxicos que permitem elucidar a toxicocinética e a toxicodinamia de xenobióticos no organismo (Lasley, 2019).

A monitorização *in vivo* no cérebro tem, assim, uma importante aplicabilidade oferecendo resultados consistentes e robustos e que, ao contrário dos métodos *ex vivo* (i.e., cortes histológicos), compreendem a dinâmica da função cerebral.

Técnicas de deteção *in vivo* existentes

Ao longo dos anos, têm vindo a ser desenvolvidas uma variedade de técnicas para a monitorização *in vivo* de substâncias neuroquímicas no cérebro sendo que estas podem ser técnicas invasivas ou técnicas não-invasivas. Para além da resolução temporal e espacial, outros fatores podem ser considerados quando se comparam estes dois tipos de técnicas (Schultz e Kennedy, 2008).

A. Técnicas não-invasivas: PET scanning

No conjunto das técnicas não-invasivas mais utilizadas podemos encontrar a tomografia de emissão de positrões (PET). A tecnologia da PET baseia-se na administração de um composto marcado radioactivamente (*radiotracer*) e, através de um scan é produzida uma imagem tridimensional detalhada do cérebro. Aparte da baixa resolução temporal (ca. 10s) e resolução espacial (ca. 1 cm³), e embora tenha a enorme vantagem de ser uma técnica não-invasiva, a PET é, por outro lado, uma técnica muito dispendiosa, limitada a apenas um pequeno conjunto de analitos e, geralmente, não se adequa a estudos em pequenos animais de laboratório (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

B. Técnicas invasivas: Sensores e biossensores vs. microdiálise

Dentro das técnicas invasivas destacam-se as técnicas eletroquímicas *in vivo*, que recorrem a microelétrodos (microssensores) ou a microelétrodos enzimáticos (biossensores) para a deteção das substâncias neuroquímicas. Os microssensores têm sido otimizados ao longo dos anos e, atualmente, constituem técnicas de elevada resolução espacial e elevada resolução temporal, permitindo realizar estudos em tempo real. Para além disso, utilizam-se elétrodos de dimensões muito reduzidas, sendo o dano tecidual muito pequeno (Robinson *et al.*, 2008). Porém, os microssensores possuem uma baixa capacidade de determinar concentrações basais dos analitos, bem como a detetar variações nas concentrações ao longo do tempo e apenas estão disponíveis para um número limitado de substâncias neuroquímicas (Schultz e Kennedy, 2008).

Outro método invasivo de monitorização de substâncias neuroquímicas amplamente utilizado é a microdiálise. A microdiálise possui uma resolução temporal e espacial mais baixa

que os microsensores e, uma vez que recorre a sondas de maiores dimensões do que os microeléctrodos, tem maior probabilidade de causar danos no tecido cerebral. No entanto, possui outras características passíveis de fornecer informação complementar aos microsensores e a PET. Como técnica de amostragem, a microdiálise pode ser acoplada a várias técnicas analíticas (como HPLC ou métodos enzimáticos), permitindo que virtualmente todos os neurotransmissores sejam quantificados com alta sensibilidade e seletividade e, em muitos casos, múltiplos analitos possam ser detetados na mesma amostra (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

Adicionalmente, e dado que os dialisados podem ser recolhidos ao longo do tempo, a microdiálise possui a capacidade de determinar as concentrações basais e as variações dinâmicas na química cerebral. Ao longo dos anos, a técnica da microdiálise acoplada a métodos bioanalíticos sensíveis tem sido aprimorada, proporcionando uma resolução temporal de 1-2 minutos. Acrescente-se, ainda, o facto da microdiálise ser uma técnica de baixo custo e relativamente fácil de aplicar (Watson, Venton e Kennedy, 2006).

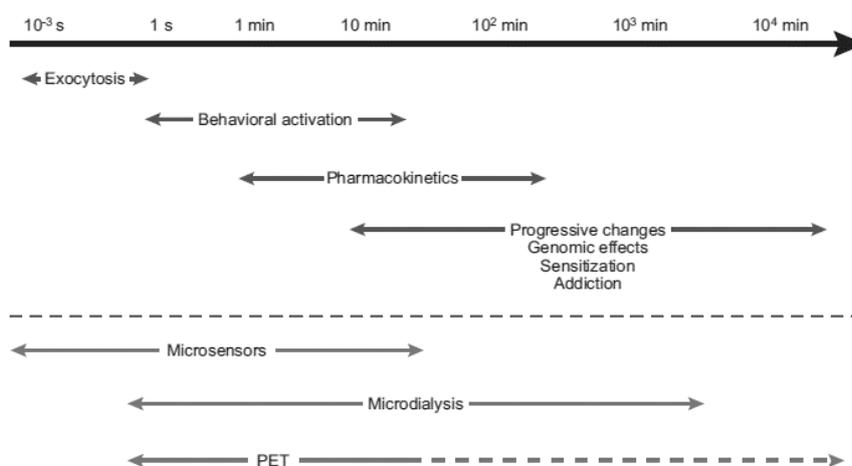


Fig. 2: Comparação da resolução temporal das várias técnicas neuroquímicas. Adaptado de (Schultz e Kennedy, 2008)

Capítulo II: Microdiálise cerebral

Perspetiva histórica

O termo *diálise* (do grego *dyálisis* «separar») significa a separação de moléculas através da passagem destas por uma membrana semipermeável, por difusão passiva. Baseando-se no mesmo princípio da hemodiálise, a microdiálise cerebral difere da anterior no objetivo: enquanto que a hemodiálise consiste em remover substâncias do fluido sanguíneo, a microdiálise cerebral tem como finalidade a recolha de uma amostra (dialisado) para análise e, através dos resultados obtidos, retirar informações sobre as substâncias neuroquímicas e a sua relação com o comportamento, genética e intervenções farmacológicas (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

Embora a microdiálise seja utilizada como técnica de amostragem em diversos sistemas anatómicos, tais como o sangue, fígado, músculo, etc., é ao cérebro e à monitorização de substâncias neuroquímicas que a microdiálise deve os seus avanços mais recentes, sendo que é precisamente neste órgão onde esta é mais aplicada. A microdiálise *in vivo* é uma técnica sucedânea da técnica de perfusão *push-pull*, um método desenvolvido na década de 60 e que consiste no contacto do meio de perfusão com o espaço extracelular (Darvesh *et al.*, 2011).

Na técnica *push-pull*, o meio de perfusão é colocado na área alvo da análise (*push*) e retirado com a mesma velocidade (*pull*), sendo que este processo deve ser realizado de uma forma altamente sincronizada. Esta técnica caiu em desuso vez que é praticamente impossível de controlar o fluxo do fluido extracelular e, ainda, controlar a degradação dos neurónios pelo contacto direto com o meio de perfusão, pois, sendo os neurónios sensíveis à pressão, há uma maior contaminação do perfusado com resíduos celulares (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

Embora obsoleta, foi a partir da modificação das sondas de perfusão *push-pull* que emergiu a microdiálise cerebral. A microdiálise colmata as falhas da *push-pull* pois separa o meio de perfusão do tecido cerebral através de uma membrana semipermeável. A popularidade e aplicações da microdiálise cerebral, como técnica *in vivo* de quantificação dos níveis de neurotransmissores em animais de laboratório deve-se principalmente aos trabalhos desenvolvido por Ungerstedt e colegas do Instituto Karolinska em Estocolmo, Suécia, durante as décadas de 70 e 80 (Ungerstedt e Pyock, 1974).

Fundamento do método

A diálise ou, por outras palavras, a separação do analito do tecido, consiste na inserção de uma sonda de microdiálise diretamente na região de interesse, no caso de estudos agudos, ou através de uma cânula implantada previamente, quando a monitorização é subcrónica. O perfusato, uma solução aquosa de composição e pH similares ao fluido extracelular, mas sem o analito de interesse, é bombeado através da sonda. Não existe contacto direto entre o perfusato e o fluido extracelular devido à presença de uma membrana semipermeável, que limita a passagem de moléculas de acordo com o gradiente de concentração (difusão passiva), sendo que a taxa de fluxo depende da massa molecular, polaridade e estrutura do analito.

As moléculas passam livremente através da membrana até que se igualem as concentrações entre o meio de perfusão e o fluido extracelular atingindo-se, assim, o equilíbrio. O perfusado é infundido continuamente e lentamente através da sonda até ao todo de recolha, onde é colhido o dialisado para posterior análise (Chefer *et al.*, 2009).

O dialisado contém todas as moléculas de menores dimensões e de tamanho suficiente para difundir através da membrana semipermeável da sonda e a sua quantificação é apenas limitada à seletividade e sensibilidade do método analítico utilizado. Desta forma, a microdiálise é uma técnica multianalito, podendo ainda ser realizadas modificações nas condições de perfusão ou na escolha adequada da membrana para aumentar a lista de possíveis analitos, como neurotransmissores, hormonas, fármacos, neuropeptídeos, metabolitos, etc. (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

Uma representação da técnica de microdiálise cerebral encontra-se esquematizada na Figura 3.

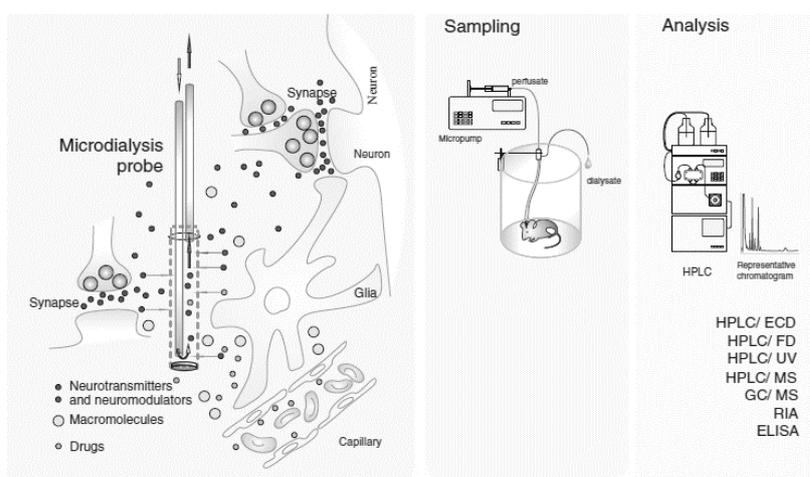


Fig. 3: Esquematização da técnica de amostragem por microdiálise cerebral. adaptado de (Anderzhanova e Wotjak, 2013)

Existem determinadas vantagens que dão popularidade à microdiálise cerebral e garantem a sua ampla utilização ao longo dos anos (Westerhout *et al.*, 2012):

- I) **Monitorização em animais despertos:** A microdiálise permite a monitorização de substâncias neuroquímicas em animais despertos e com liberdade de movimentos durante vários dias recorrendo, neste caso, ao implante de cânulas que sustentam a sonda. Isto permite recolher informações sobre a neurotransmissão e atividade neuroquímica, bem como a farmacocinética e o metabolismo.
- II) **Amostragem in vivo sem distúrbio da homeostase:** Ao contrário de outras técnicas de amostragem, como o caso da *push-pull*, a microdiálise não remove grandes moléculas, proteínas e enzimas da matriz extracelular, nem remove grandes quantidades de fluido, uma vez que a composição do perfusado é similar à do espaço extracelular. A membrana semipermeável protege ainda o tecido de infeções exógenas e, cada vez mais, se recorre à utilização de sondas compostas por materiais biocompatíveis.
- III) **Resoluções temporal e espacial eficientes:** A resolução temporal de minutos e a resolução espacial de apenas milímetros permitem a amostragem de regiões do cérebro de pequenas dimensões durante avaliações da performance comportamental.
- IV) **Possibilidade de acoplar um elevado número de métodos analíticos:** A variedade de métodos com elevada sensibilidade que se podem acoplar à microdiálise é grande, permitindo, assim, detetar e quantificar um grande número de analitos simultaneamente.
- V) **Retrodiálise:** Uma vez que a passagem de moléculas através da membrana é bidirecional, as sondas de microdiálise podem ser utilizadas para a administração de fármacos hidrofílicos no local de ação, num processo designado por retrodiálise, e o tempo e dose de resposta podem ser determinados com precisão.
- VI) **Sem necessidade de purificação da amostra:** Uma vez que não há possibilidade de degradação enzimática, o dialisado não necessita de ser purificado antes da análise. Por isso, a microdiálise pode ser diretamente acoplada ao instrumento analítico para a deteção e quantificação, tornando possível a realização de análises *on-line*.
- VII) **Dados farmacocinéticos e farmacodinâmicos:** Uma vez que a microdiálise avalia a concentração de fármaco livre no local de ação, é a única técnica até à data

que fornece resultados clinicamente relevantes sobre a farmacocinética e da farmacodinâmica.

VIII) Vasta aplicabilidade: A diversidade de extensões e modificações da microdiálise atrai diferentes ramos da investigação (neurofarmacologia, neuroquímica, neurotoxicologia, psicologia, fisiologia, etc.).

No entanto, esta técnica também apresenta alguns inconvenientes (Chaurasia *et al.*, 2007):

- I) **Cirurgia:** O implante estereotáxico da sonda requer um procedimento cirúrgico desgastante levando a que os animais necessitem de recobro de pelo menos 5-7 dias.
- II) **Lesões no local de aplicação:** A implementação da sonda pode desencadear modificações no local de aplicação (hipervascularização, edema e hemorragia). Estas lesões desaparecem ao fim de 12-24h o que implica que a medição só possa ser iniciada findo este tempo.
- III) **Profundidade de penetração:** Manipulações com mudanças dramáticas na concentração do analito no espaço extracelular podem levar à chamada “profundidade de penetração”. Este parâmetro depende do transporte plasma-espaço extracelular e taxa de metabolismo que alteram a resolução espacial da membrana. No caso de regiões cerebrais pequenas a profundidade de penetração pode resultar na contaminação do dialisado com analitos de regiões adjacentes à pretendida.
- IV) **Analitos lipofílicos:** Uma vez que o perfusado é uma solução aquosa, a diálise de substâncias lipofílicas torna-se difícil. Compostos pouco polares têm uma cinética de recolha mais lenta e, portanto, necessitam de mais tempo para atingir o equilíbrio.

Considerações importantes na amostragem por microdiálise

As características da amostragem por microdiálise são variadas e muito atrativas do ponto de vista prático. A característica fulcral nesta técnica é o facto de se conseguir recolher uma amostra de fármaco ou de um composto endógeno no local de ação, tornando possível relacionar diretamente a concentração do analito com o efeito farmacológico (Plock e Kloft, 2005). A microdiálise não apresenta restrição quanto ao número de amostras obtidas, uma vez que não altera o volume do fluído extracelular, permitindo adquirir informações em

pontos discretos no tempo e a obtenção de dados em períodos contínuos (Weiss, Lunte e Lunte, 2000).

No entanto, e como qualquer técnica, a microdiálise apresenta limitações e certas considerações importantes devem ser tidas em conta quando se elabora o design de um estudo e se aplica a microdiálise.

A. Tipo de analito

As propriedades do analito e da membrana da sonda de microdiálise influenciam o comportamento químico e físico no momento da recolha da amostra. A membrana da sonda é, geralmente, permeável a analitos hidrofílicos de baixo peso molecular tornando estes compostos os analitos ideais para a aplicação da microdiálise. Compostos muito lipofílicos, com pesos moleculares elevados ou ligados a proteínas não são apropriados para esta técnica. Também podem ocorrer interações electrostáticas ou por adsorção se tanto o composto como a membrana de diálise apresentarem carga ou grupos fortemente polares (Davies *et al.*, 2000). Certos parâmetros podem ser alterados de forma a contornar as limitações, porém, os parâmetros relativos ao analito, como a sua polaridade, peso molecular e propriedades de difusão, são parâmetros fixos.

B. Sondas de microdiálise

A escolha da sonda é um aspeto crucial na amostragem por microdiálise. A sonda deve ser apropriada à recuperação do analito (que normalmente é alta, mas deve, pelo menos, ser reprodutível) e apropriada à resolução espacial exigida para o tecido ou sistema em análise. No caso do cérebro, sendo um órgão heterogéneo, as sondas devem ser muito pequenas de forma a permitir uma elevada resolução espacial (Davies *et al.*, 2000).

As mais utilizadas na microdiálise cerebral são as sondas concêntricas. A sonda consiste em dois tubos microbore revestidos com uma membrana semipermeável posicionados um dentro do outro (**Figura 4**). O perfusato é bombeado pelo tubo de entrada da sonda, passa para a zona ativa da membrana criando um gradiente de concentração entre o fluido extracelular e o lúmen da sonda que facilita a passagem por difusão passiva dos compostos de interesse (e apenas os que estão abaixo do *cutoff* da membrana) para o meio de perfusão. O dialisado é depois recolhido pelo tubo de saída e é enviado diretamente para o sistema cromatográfico ou de eletroforese capilar (Watson, Venton e Kennedy, 2006). Tipicamente, extremidade da sonda tem 200-400µm de diâmetro e um comprimento de 1-4mm.

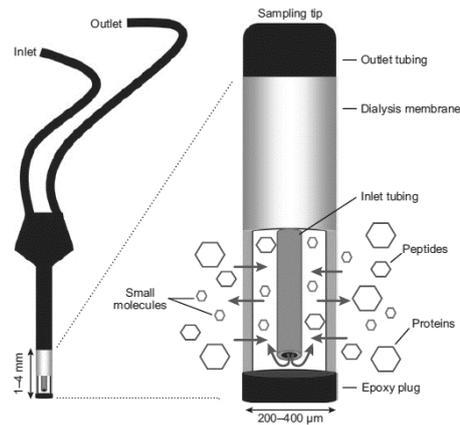


Fig. 4: Representação de uma sonda de microdialise concêntrica. Adaptado de (Schultz e Kennedy, 2008)

C. Colheita e análise do dialisado

A recuperação de analito relaciona-se inversamente com o fluxo de perfusão. De forma a obter concentrações de analito elevadas é fulcral manter um baixo fluxo de perfusão. Geralmente, o fluxo de perfusão é de $0,1-2\mu\text{L min}^{-1}$, no entanto, estes valores podem diferir dependendo do tipo de estudo que se esteja a efetuar: para estudos pré-clínicos utilizam-se fluxos mais altos ($0,5-2\mu\text{L min}^{-1}$) de forma a recolher o máximo de analito possível; para as análises clínicas, como a monitorização de piruvato, lactato, glucose e outros metabolitos, recorre-se aos fluxos de perfusão mais baixos e, assim, obter concentrações de analito mais próximas das concentrações do fluido extracelular (Hammarlund-Udenaes, 2017).

A estes fluxos, o método analítico deve ser capaz de analisar pequenos volumes de dialisado, para que se possibilite uma resolução temporal apropriada. Embora os baixos volumes de amostra sejam desafiantes do ponto de vista analítico, uma boa resolução temporal é uma vantagem valiosa em relação aos métodos de colheita clássicos. Portanto, resoluções temporais adequadas requerem métodos analíticos de alta sensibilidade que detetem os analitos em volumes de amostra muito reduzidos (Schultz e Kennedy, 2008). A complexidade das amostras biológicas também é um desafio no processamento e análise do dialisado, sendo necessário o recurso a técnicas avançadas de separação dos compostos da amostra. A cromatografia líquida de elevada pressão ou eficiência (HPLC) é das técnicas de separação mais utilizadas atualmente. Depois de separados, os analitos devem ser detetados. Existem vários tipos de detetores, como o espectrofotométrico, o espectrofluorimétrico, o espectrómetro de massa e o detetor eletroquímico. Estes detetores encontram-se, geralmente, acoplados e em linha com o sistema separativo (Schultz e Kennedy, 2008).

A escolha das técnicas separativas e dos detetores dependem, fundamentalmente, do tipo de analito em questão. Os métodos analíticos para a separação e detecção são descritos em maior detalhe no capítulo seguinte.

D. Implante da sonda e resposta tecidular

A implantação das sondas de microdiálise requer grande experiência por parte do investigador e, dependendo do tecido ou órgão, pode ser mais (ex.: cérebro) ou menos invasiva (ex.: músculo esquelético), sendo o tempo de recuperação maior ou menor, respetivamente.

A inserção da sonda no cérebro pode resultar no trauma do tecido circundante e que pode influenciar os resultados da técnica. Estudos iniciais do dano causado pelas sondas demonstraram que o fluxo sanguíneo e o metabolismo da glucose diminuem perto da sonda imediatamente após o seu implante, no entanto, os valores de recuperação do analito estabilizam para valores normais dentro das 24 horas seguintes (Schultz e Kennedy, 2008). Vários estudos histológicos também demonstraram dano tecidular associado ao implante da sonda de microdiálise, com neurónios danificados e perda de resposta sináptica nas imediações do local de implante da sonda. Os mesmos estudos também verificaram a presença de gliose e edema, bem como disrupção celular a uma distância de 1.4mm do implante (Clapp-Lilly et al., 1999).

Embora os distúrbios no tecido cerebral sejam mínimos, e as medições possam proceder normalmente ao fim de 12-24 horas após o implante, a presença de neurónios lesados, de outras células, mediadores inflamatórios e leucócitos decorrentes de hemorragias deve ser considerada quando se interpretam os resultados obtidos por amostragem por microdiálise cerebral.

Recuperação e calibração das sondas

Uma vez que a microdiálise não é efetuada sob condições de equilíbrio a concentração do analito na amostra irá ser apenas uma fração da sua real concentração no fluido em análise. A eficiência da sonda de microdiálise (recuperação da sonda) é estabelecida pela razão entre a concentração do analito no dialisado e a sua concentração no fluido extracelular. (Chefer et al., 2009)

Esta razão pode adotar duas formas distintas e importantes de distinguir: a recuperação absoluta e a recuperação relativa (Figura 5-A). A recuperação absoluta é definida como a

quantidade absoluta de composto recuperado durante um período de tempo definido (expressa em mol/min.) e é igual a zero quando a taxa de fluxo é nula e atinge o seu máximo a fluxos elevados. A recuperação relativa estabelece que a concentração do analito no dialisado (C_{out}) é inferior à sua concentração no tecido (C_{ext}) e por isso:

$$RR_{(relative\ recovery)} = C_{out}/C_{ext}$$

A determinação da RR é um requisito para o cálculo da concentração do analito no tecido e pode ser determinada *in vitro* ou *in vivo*, porém a RR *in vitro* nem sempre confere uma estimativa fiável da recuperação *in vivo* dada a complexidade da matriz cerebral, que leva a que a recuperação *in vivo* seja, normalmente, menor do que aquela observada *in vitro* (Robinson et al., 2008).

In vitro, as sondas estão colocadas numa solução homogénea e de grande volume e a difusão do analito na membrana está relativamente desimpedida. No caso de estudos *in vivo* no cérebro apenas uma pequena fração do analito é recuperado uma vez que as moléculas necessitam de se difundir por um ambiente mais sinuoso até atingir a sonda podendo, ainda, ser transportadas para o interior das células e metabolizadas (Schultz e Kennedy, 2008). Dada a problemática com a extrapolação dos resultados da RR *in vitro* foram desenvolvidos vários métodos para a calibração *in vivo*, sendo o mais popular o método do fluxo líquido zero (*no net flux*- NNF).

No método NNF (Figura 5-B) a sonda perfundida com o soluto contendo o composto de interesse em diferentes concentrações (4-5 níveis de forma randomizada), e onde se espera que esteja incluída a concentração do analito no fluido extracelular. Quando a concentração do composto no perfusado é maior do que a concentração no meio extracelular este sofre difusão através da membrana para o meio exterior, diminuindo a concentração do analito no dialisado ($C_{inlet}-C_{outlet}$ negativo); se, pelo contrário, a concentração do analito no perfusado for menor que a concentração no espaço extracelular então o composto é difundido no sentido de entrada na sonda, aumentando a concentração do dialisado ($C_{inlet}-C_{outlet}$ positivo). O balanço entre os ganhos e as perdas é determinado por uma função e quando a concentração do analito no perfundido for igual à do dialisado, ou seja, quando há interseção da função com a abcissa, então a transferência de analito através da membrana é nula significando que a concentração do perfundido é igual à concentração do composto no tecido em análise (*no net flux*). O declive da reta reflete a recuperação relativa da membrana da sonda de microdiálise (Anderzhanova e Wotjak, 2013).

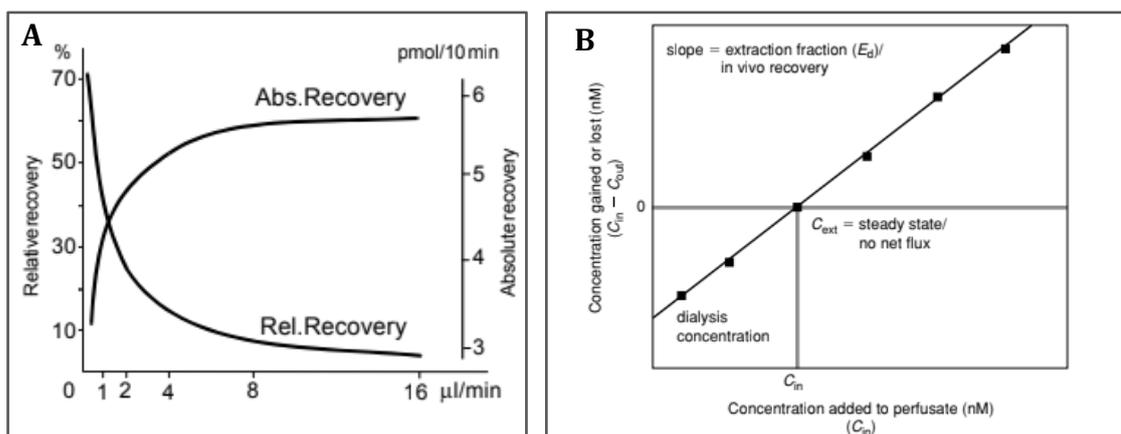


Fig. 5: Recuperação e calibração de sondas de microdialise. **(A)** Variação da recuperação da recuperação absoluta e da recuperação relativa da dopamina em função do fluxo de perfusão, adaptado de (Elliason, 1991) **(B)** Gráfico representativo do método microdialise *no net flux*. Adaptado de (Zapata, Chefer e Shippenberg, 2009).

A determinação da capacidade de recuperação de uma sonda de microdialise é um dos obstáculos desta técnica de amostragem considerando que depende de vários fatores: quanto menor o fluxo de perfusão, maior a taxa de recuperação da sonda; a recuperação também é proporcional à área de superfície da membrana, porém, as dimensões da extremidade da sonda dependem do tecido e região em análise; um analito pouco polar e com elevado PM limitam a recuperação; o coeficiente de difusão é diretamente proporcional à temperatura; a difusão em tecidos é significativamente menor do que em soluções aquosas (Chefer *et al.*, 2009).

Capítulo III: Métodos analíticos para detecção e quantificação dos dialisados

Como exposto anteriormente, a microdialise oferece a possibilidade de ser acoplada a uma vasta gama de técnicas analíticas que detetam e quantificam os analitos de interesse no dialisado.

Resoluções temporais elevadas requerem uma elevada sensibilidade e capacidade de análise de pequenos volumes de amostra, pelo que as modificações realizadas de forma a otimizar a resolução temporal prendem-se maioritariamente na melhoria do limite de detecção dos métodos analíticos, pois estes são, comumente, o fator limitante (Schultz e Kennedy, 2008).

As técnicas analíticas podem ser realizadas tanto *online* como *offline*. Os métodos *offline* consistem na separação da etapa da detecção da técnica de amostragem, isto permite que múltiplos testes possam ser realizados simultaneamente e, além disso, permite uma maior

flexibilidade em estudos muito demorados. A principal dificuldade da análise *offline* consiste no manuseamento de amostras muito pequenas, pois podem ser geradas centenas de dialisados na ordem dos microlitros em apenas um dia.

Os métodos *online*, ao contrário dos anteriores, têm como vantagem o manuseamento mínimo da amostra porque o dialisado é imediatamente bombeado do tubo de saída da sonda para o detetor. É também benéfico pois permite a monitorização da saída do dialisado durante o procedimento, assegurando uma correta colheita da amostra. Pode também ser útil em casos em que a obtenção rápida de dados é fundamental como, por exemplo, a monitorização durante uma cirurgia. Contudo, manifesta requisitos exigentes do ponto de vista da velocidade do procedimento: a duração da técnica limita a resolução temporal.

Os métodos também podem ser não separativos, que monitorizam um analito de cada vez, ou métodos separativos, que permitem a monitorização de múltiplos analitos em cada amostra (Davies *et al.*, 2000).

Métodos analíticos não-separativos

A. Sensores e biossensores

Os sensores, em particular os biossensores, têm sido combinados com a microdialise para a monitorização *online* tanto *in vitro* como *in vivo*. A montagem consiste na sonda de microdialise e o biossensor (enzimático) ligado a um detetor eletroquímico (EC). A enzima está presente para conferir especificidade ao analito e para converter o analito numa espécie eletroativa e passível de ser detetada pelo detetor (Davies *et al.*, 2000). Embora o tempo de resposta deste sistema seja inferior ao da técnica de microelectrodos implantáveis, a microdialise acoplada aos biossensores permite uma análise mais quantitativa, uma calibração mais fácil e ultrapassa o problema da interferência das proteínas, uma vez que estas foram excluídas do dialisado pelo cutoff da membrana.

Um exemplo muito prático é a quantificação de lactato decorrente do metabolismo em tecidos. A determinação do lactato é feita, tradicionalmente, por técnicas bioquímicas *ex vivo*, que muitas vezes não refletem a dinâmica e fisiologia deste metabolito. Através do acoplamento da microdialise a biossensores do lactato construídos com base na enzima lactato oxidase imobilizada num suporte polimérico à superfície de um eléctrodo (ex.: Pt) consegue-se uma monitorização contínua do lactato. É, assim, possível traçar um perfil dinâmico deste metabolito durante várias atividades (exercício físico, ou após uma refeição), permitindo uma análise e interpretação de resultados mais correta (Volpe *et al.*, 1995).

B. Espectrometria de massa

A detecção por espectrometria de massa em tandem (MS-MS) apresenta elevada sensibilidade e seletividade, e a capacidade de identificar analitos com base nos seus pesos moleculares sendo, assim, uma escolha atrativa para a análise de amostras obtidas por microdiálise. A MS também tem como enorme vantagem a possibilidade de analisar todo o tipo de analitos em pequenos volumes de amostras e em muito baixas concentrações, características muito frequentes dos dialisados.

O maior obstáculo à detecção por MS é a elevada força iónica da amostra e, para isso, são feitas modificações à técnica, como, por exemplo, a inclusão de uma etapa off-line de extração dos sais do dialisado através da extração em fase sólida C_{18} (SFE) previamente à análise por MS-MS (Prokai *et al.*, 1998), ou então com recurso a água desionizada como perfundido (Wong *et al.*, 1999).

Por outro lado, uma baixa força iónica do perfundido podem alterar a pressão osmótica da sonda afetando a sua recuperação.

C. Ensaio imunoenzimático

O acoplamento da microdiálise com imunoenaios tem sido usado para a monitorização de peptídeos e certos fármacos. A recuperação de neuropeptídeos pela membrana da sonda é muito inferior à recuperação de analitos com peso molecular mais baixo. Isto leva a que a amostra contenha muito pouco analito estando, portanto, muito diluída (na ordem dos picomolar).

Uma técnica capaz de detetar estas baixas quantidades de analito em pequenos volumes de dialisado e com boa resolução temporal são os ensaios imunoenzimáticos (Lindfors, Brodin e Ungerstedt, 1987). Os primeiros estudos aplicaram os radioimunoensaios (RIA) a uma série de diferentes peptídeos, neuropeptídeos, substância P, neurotensina e peptídeos opióides.

Embora os imunoenaios sejam altamente sensíveis, a técnica em si é muito morosa, muitas vezes os anticorpos demonstram reatividade cruzada podendo levar a erros na interpretação dos resultados e, ainda, a geração de resíduos radioativos, no caso do RIA.

Outro método imunoenzimático muito utilizado é o método ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*). Este método surgiu na década de 70 pela modificação do método RIA, ou seja, enquanto o RIA recorre a radioisótopos para a detecção do conjugado Ag-Ac, no ELISA

a detecção do Ag-Ac é realizada através de enzimas. O método ELISA é tão sensível quanto o RIA, não necessita de equipamento especial ou de utilizar compostos radioativos (Aydin, 2015).

Métodos analíticos separativos

Os dialisados consistem, sobretudo, em soluções aquosas contendo moléculas hidrofílicas de baixo peso molecular e, por isso, estas características tornaram a cromatografia líquida (LC) e a eletroforese capilar (CE) os métodos mais populares para a análise dos microdialisados. A cromatografia líquida de elevada pressão ou eficiência (HPLC) e a cromatografia líquida capilar (cLC) são as formas de cromatografia líquida mais compatíveis com a injeção dos microdialisados, enquanto que EC recorre-se à eletroforese capilar de zona ou à cromatografia micelar eletrocínética (MEKC) (Davies *et al.*, 2000).

O método de detecção é decisivo: alguma seletividade é conferida pelo método de separação, no entanto, e dada a complexidade da amostra, o método de detecção também deve ser seletivo. Ensaios imunoenzimáticos, espectrofotometria-UV, métodos eletroquímicos, de fluorescência e espectrometria de massa são os detetores mais utilizados na LC. Já para a CE utiliza-se a detecção por eletroquímica ou fluorescência induzida por laser (LIF).

A. Cromatografia líquida de elevada pressão ou eficiência (HPLC)

A HPLC é um método cromatográfico de separação dos constituintes da amostra pela passagem do solvente (fase móvel ou eluente), onde a amostra está diluída, através de uma coluna cromatográfica, que contem a fase estacionária, geralmente de natureza apolar (fase reversa) constituída por partículas de muito pequenas dimensões (ex.: 3-5 μ m) e que, por essa razão, geram pressões muito elevadas no sistema cromatográfico. A separação dos componentes na fase móvel é realizada pela interação destes com a fase estacionária. Os componentes da amostra permanecem mais ou menos tempo retidos na coluna cromatográfica em função da sua interação com ambas as fases- o designado tempo de retenção. A passagem dos compostos de uma fase para a outra depende de vários fatores, entre os quais a adsorção com a fase estacionária, a partição entre fases, troca iónica, etc. (Skoog *et al.*, 2014).

O limite de detecção (LOD) da HPLC obriga a que a amostra seja recolhida em frações temporais de 15-30 minutos, limitando a resolução temporal da microdiálise. A sensibilidade da técnica depende significativamente do detetor utilizado, sendo os detetores de massa, eletroquímicos e de fluorescência os que oferecem melhores sensibilidades. Em alguns casos,

deteções com elevada sensibilidade podem permitir resoluções temporais de 1-2 minutos. Um avanço significativo no aumento na sensibilidade da técnica de cromatografia líquida foi o recurso a colunas de HPLC microbore. Enquanto que as colunas tradicionais apresentam diâmetros de 4-5mm, as colunas de microbore têm diâmetros na ordem dos 0.3-1.0mm, implicando que a solução que passa pela coluna esteja menos diluída antes de atingir o detetor e, portanto, seja mais fácil de este detetar o analito (McLaughlin, Faibushevich e Lunte, 2000).

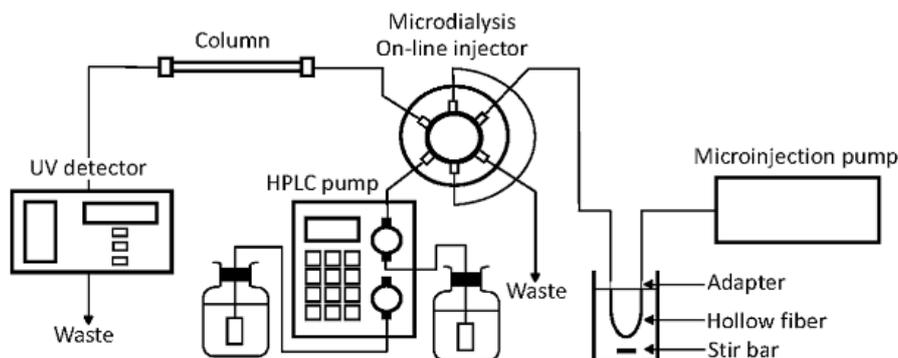


Fig. 6: Proposta do sistema online microdiálise-HPLC. Adaptado de (Chao *et al.*, 2011).

B. Cromatografia líquida capilar (cLC)

Mais recentemente, a cromatografia líquida capilar emergiu como potencial método na análise das amostras recolhidas por microdiálise. As colunas da cLC possuem diâmetros de 25-150 μ m, requerem um menor volume de amostra, reduzindo o consumo de fase móvel, e melhora a eficiência de ionização uma vez que utiliza taxas de fluxo na ordem dos μ L permitindo, assim, otimizar os limites de deteção e a resolução temporal (Shackman *et al.*, 2007).

O recurso à cLC também melhora a compatibilidade com a espectrometria de massa (MS), permitindo atingir limites de deteção muito baixos. Isto é especialmente importante quando o analito se encontra em quantidades muito pequenas, como o caso dos neuropeptídeos. A cLC-MS proporciona a deteção de múltiplos peptídeos com especificidade e, este princípio é aplicável a todos os neuropeptídeos sem derivatização. Nesta técnica são gerados fluxos na ordem dos nanolitros, aumentando a eficácia de ionização da amostras (Andrén e Caprioli, 1999).

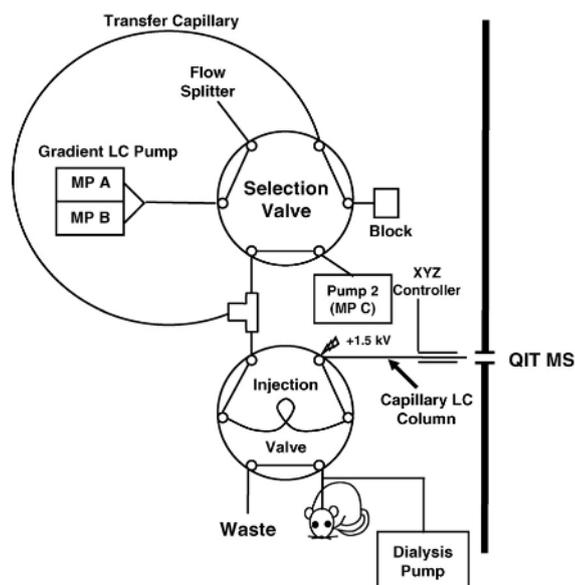


Fig. 7: Diagrama do sistema cLC-MS. Adaptado de (Shackman *et al.*, 2007).

Ainda que a cLC ofereça uma elevada sensibilidade e, portanto, uma elevada resolução temporal, existem algumas dificuldades quando à aplicabilidade deste método. A estabilidade das colunas capilares é menor, em relação às colunas comerciais de HPLC, quebrando ou rachando em muitas das vezes sendo necessária uma nova coluna a cada amostra de dialisado recolhida.

C. Eletroforese capilar

A eletroforese capilar (CE) é um método que pode ser acoplado à microdiálise, uma vez que é adequado para conseguir uma boa resolução temporal e os limites de deteção da CE com deteção por fluorescência induzida por laser (LIF) podem ser muito baixos. A CE permite uma rápida análise e pode ser processada de forma on-line ou off-line. A velocidade de separação dos compostos consegue ser na ordem dos segundos, uma vantagem muito grande quando comparada com os minutos necessários para separações equivalentes por HPLC (Kennedy *et al.*, 2002).

Os primeiros estudos eletroforéticos acoplados à microdiálise foram os estudos off-line. Na técnica off-line, o dialisado é recolhido e misturado com o meio de derivatização. Posteriormente, a amostra derivatizada é injetada no capilar. Embora apenas sejam injetados nanolitros, esta abordagem da CE necessita de uma amostra de μL e, assim, não apresenta uma vantagem significativa do ponto de vista da resolução temporal (Sauvinet *et al.*, 2003).

Na CE on-line, a amostragem, derivatização e separação ocorrem continuamente e automaticamente. Nesta abordagem, o dialisado é derivatizado e periodicamente injetado no sistema CE. A eletroforese capilar em linha provou possuir elevada eficiência de separação e boa resolução temporal a baixos fluxos ($75\text{-}155\ \mu\text{L}\ \text{min}^{-1}$), permitindo quase 100% de recuperação relativa da sonda (Hooker e Jorgenson, 1997).

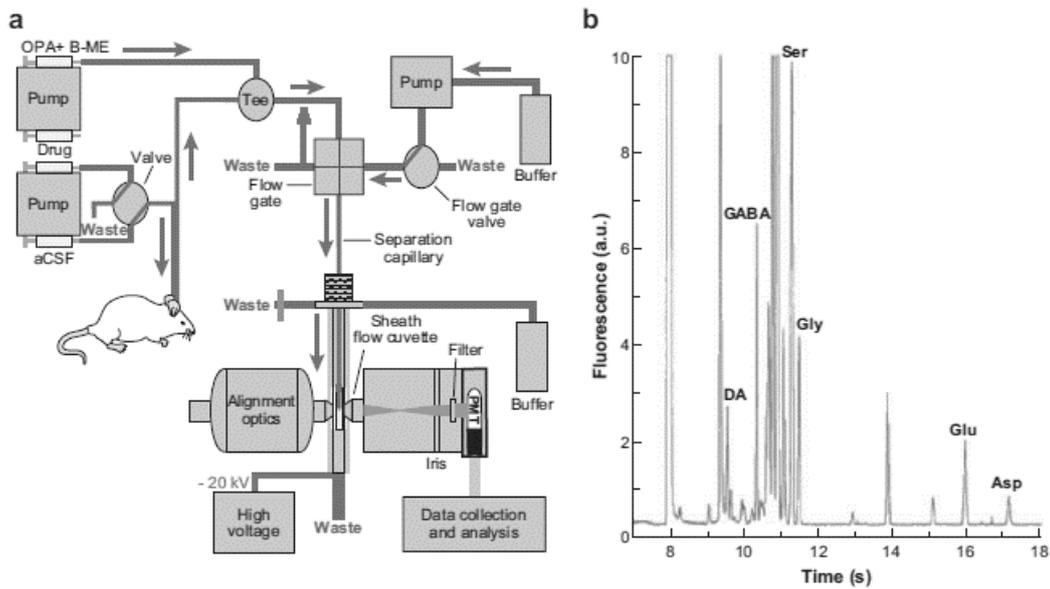


Fig. 8: Diagrama do sistema CE-LIF *online*. Adaptado de (Schultz e Kennedy, 2008).

Conclusão

A amostragem por microdiálise permite um vislumbre significativo do intrincado SNC, permitindo não só perceber como é realizada a neurotransmissão, neuromodulação e o neurometabolismo, gerando conhecimento à cerca da função cerebral e relacionando-o com o comportamento humano, como também entender como as alterações destes processos afetam o organismo como um todo, delineando os princípios da fisiopatologia do cérebro. A microdiálise é, também, uma ferramenta valiosíssima em ensaios clínicos e estudos toxicológicos, uma vez que permite monitorizar a quantidade de fármacos e substâncias tóxicas que exercem ação neste órgão tendo, principalmente, como vantagem a identificação e quantificação destes xenobióticos no seu local de ação e, desta forma, obter resultados mais precisos e robustos. Assim, este método de amostragem é uma técnica considerada *golden standard* em inúmeras áreas das neurociências, como a neurobiologia, neurofarmacologia, toxicologia, entre outras. É, igualmente, muito útil para o diagnóstico de doenças neurodegenerativas e para a avaliação do prognóstico de lesões cerebrais em unidades de cuidados intensivos.

A microdiálise, que viu a sua popularidade crescer a partir da década de 80, implica a implantação de uma sonda de microdiálise no tecido cerebral sendo, portanto, uma técnica invasiva e, em muito, comparada com os sensores e biossensores. São inúmeras as vantagens inerentes à microdiálise, sendo as mais importantes a resolução temporal, a capacidade multianalito e a possibilidade de serem acoplados um vasto número de métodos de identificação e quantificação. Por outro lado, a microdiálise apresenta alguns inconvenientes e limitações tais como a necessidade de cirurgia para o implante da sonda, o dano tecidual e a problemática da recolha de analitos muito lipofílicos. Assim, e embora a microdiálise seja uma importante técnica bioanalítica para o estudo do cérebro, constantes melhoramentos e adaptações são sempre necessárias.

O cálculo da concentração do analito no tecido cerebral é realizado através da determinação da recuperação relativa podendo ser determinada *in vitro* ou *in vivo*. Dado que a determinação *in vitro* nem sempre fornece resultados confiáveis e que a determinação *in vivo* trabalha com a matriz complexa do cérebro, o que leva a taxas de recuperação baixas, foi desenvolvido o método *no-net-flux* para a calibração de sondas *in vivo*. No entanto, a capacidade de recuperação de sondas de microdiálise continua a ser um dos obstáculos deste método de amostragem.

Os métodos de detecção e quantificação que se podem acoplar à microdiálise podem ser métodos não-separativos, que monitorizam um analito de cada vez, como os sensores e biossensores, a espectrometria e os ensaios imunoenzimáticos, ou métodos separativos e que analisam vários analitos numa amostra apenas, tais como os métodos cromatográficos e a eletroforese capilar. A sensibilidade e seletividade da técnica da microdiálise depende, sobretudo, da sensibilidade e seletividade do método acoplado.

Conclui-se, desta forma, que a técnica de amostragem por microdiálise tem uma grande relevância nos estudos do cérebro sendo sempre necessário uma correta e cuidadosa interpretação dos resultados. Esta técnica tem, também, espaço para melhorias e otimizações, especialmente em relação ao dano tecidual causado e à recuperação das sondas. Em última análise, a eficácia deste método é tanto maior quando acoplada a métodos altamente sensíveis e seletivos.

Referências Bibliográficas

ANDERZHANOVA, Elmira; WOTJAK, Carsten T. - Brain microdialysis and its applications in experimental neurochemistry. **Cell and Tissue Research**. . ISSN 0302766X. 354:1 (2013). doi: 10.1007/s00441-013-1709-4.

ANDRÉN, Per E.; CAPRIOLI, Richard M. - Determination of extracellular release of neurotensin in discrete rat brain regions utilizing in vivo microdialysis/electrospray mass spectrometry. **Brain Research**. . ISSN 00068993. 845:2 (1999). doi: 10.1016/S0006-8993(99)01751-5.

AYDIN, Suleyman - A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**. . ISSN 18735169. 72:2015). doi: 10.1016/j.peptides.2015.04.012.

CHANG, Hsueh Yuan *et al.* - Antibody pharmacokinetics in rat brain determined using microdialysis. **mAbs**. . ISSN 19420870. 10:6 (2018). doi: 10.1080/19420862.2018.1473910.

CHAO, Yu Ying *et al.* - Using an on-line microdialysis/HPLC system for the simultaneous determination of melamine and cyanuric acid in non-dairy creamer. **Analytica Chimica Acta**. . ISSN 00032670. 702:1 (2011). doi: 10.1016/j.aca.2011.06.023.

CHAURASIA, Chandra S. *et al.* - AAPS-FDA workshop white paper: Microdialysis principles, application, and regulatory perspectives report from the joint AAPS-FDA workshop, November 4-5, 2005, Nashville, TN. Em **AAPS Journal**

CHEFER, Vladimir I. *et al.* - Overview of brain microdialysis. **Current Protocols in Neuroscience**. . ISSN 19348584. SUPPL. 47 (2009). doi: 10.1002/0471142301.ns0701s47.

CLAPP-LILLY, Kimberly L. *et al.* - An ultrastructural analysis of tissue surrounding a microdialysis probe. **Journal of Neuroscience Methods**. . ISSN 01650270. 90:2 (1999). doi: 10.1016/S0165-0270(99)00064-3.

DARVESH, Altaf S. *et al.* - In vivo brain microdialysis: Advances in neuropsychopharmacology and drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**. . ISSN 17460441. 6:2 (2011). doi: 10.1517/17460441.2011.547189.

DAVIES, Malonne I. *et al.* - Analytical considerations for microdialysis sampling. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 0169409X. 45:2-3 (2000). doi: 10.1016/S0169-409X(00)00114-9.

GUILFOYLE, Mathew R. *et al.* - Characterising the dynamics of cerebral metabolic dysfunction following traumatic brain injury: A microdialysis study in 619 patients. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 16:12 December (2021). doi: 10.1371/journal.pone.0260291.

HAMMARLUND-UDENAES, Margareta - Microdialysis as an Important Technique in Systems Pharmacology—a Historical and Methodological Review. **AAPS Journal**. . ISSN 15507416. 19:5 (2017). doi: 10.1208/s12248-017-0108-2.

HOOKER, Thomas F.; JORGENSON, James W. - A Transparent Flow Gating Interface for the Coupling of Microcolumn LC with CZE in a Comprehensive Two-Dimensional System. **Analytical Chemistry**. . ISSN 00032700. 69:20 (1997). doi: 10.1021/ac970342w.

KENNEDY, Robert T. *et al.* - In vivo neurochemical monitoring by microdialysis and capillary separations. **Current Opinion in Chemical Biology**. . ISSN 13675931. 6:5 (2002). doi: 10.1016/S1367-5931(02)00373-3.

LAMA, Rinchen D. *et al.* - Ultrafast detection and quantification of brain signaling molecules with carbon fiber microelectrodes. **Analytical Chemistry**. . ISSN 00032700. 84:19 (2012). doi: 10.1021/ac301670h.

LASLEY, Stephen M. - The Use of Intracerebral Microdialysis to Elucidate Environmentally Induced Neurotoxic Mechanisms. **Current Protocols in Toxicology**. . ISSN 19349262. 80:1 (2019). doi: 10.1002/cptx.72.

LINDEFORS, Nils; BRODIN, Ernst; UNGERSTEDT, Urban - Microdialysis combined with a sensitive radioimmunoassay. A technique for studying in vivo release of neuropeptides. **Journal of Pharmacological Methods**. . ISSN 01605402. 17:4 (1987). doi: 10.1016/0160-5402(87)90044-1.

MCLAUGHLIN, Kieran J.; FAIBUSHEVICH, Alexander A.; LUNTE, Craig E. - Microdialysis sampling with on-line microbore HPLC for the determination of tirapazamine and its reduced metabolites in rats. **Em Analyst**

NAGAI, Taku *et al.* - Dysfunction of dopamine release in the prefrontal cortex of dysbindin deficient sandy mice: An in vivo microdialysis study. **Neuroscience Letters**. . ISSN 03043940. 470:2 (2010). doi: 10.1016/j.neulet.2009.12.071.

PLOCK, Nele; KLOFT, Charlotte - Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. . ISSN 0928-0987. 25:1 (2005) 1–24. doi: 10.1016/J.EJPS.2005.01.017.

PROKAI, Laszlo *et al.* - Electrospray ionization mass spectrometric and liquid chromatographic- mass spectrometric studies on the metabolism of synthetic dynorphin a peptides in brain tissue in vitro and in vivo. **Journal of Chromatography A**. . ISSN 00219673. 800:1 (1998) 59–68. doi: 10.1016/S0021-9673(97)01295-8.

ROBINSON, Donita L. *et al.* - Monitoring rapid chemical communication in the brain. **Chemical Reviews**. . ISSN 00092665. 108:7 (2008). doi: 10.1021/cr068081q.

SAUVINET, Valérie *et al.* - In vivo simultaneous monitoring of γ -aminobutyric acid, glutamate, and L-aspartate using brain microdialysis and capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection: Analytical developments and in vitro/in vivo validations. **Electrophoresis**. . ISSN 01730835. 24:18 (2003). doi: 10.1002/elps.200305565.

SCHULTZ, Kristin N.; KENNEDY, Robert T. - Time-resolved microdialysis for in vivo neurochemical measurements and other applications. **Annual Review of Analytical Chemistry**. . ISSN 19361327. 1:1 (2008). doi: 10.1146/annurev.anchem.1.031207.113047.

SCHULZ, Pierre - Opportunities and challenges in psychopharmacology. **Dialogues in Clinical Neuroscience**. . ISSN 12948322. 21:2 (2019). doi: 10.31887/DCNS.2019.21.2/pschulz.

SHACKMAN, Holly M. *et al.* - Microdialysis coupled on-line to capillary liquid chromatography with tandem mass spectrometry for monitoring acetylcholine in vivo. **Journal of Neuroscience Methods**. . ISSN 01650270. 159:1 (2007). doi: 10.1016/j.jneumeth.2006.06.020.

SKOOG, Douglas A. *et al.* - **Fundamentals of Analytical Chemistry, Ninth Edition**

UNGERSTEDT, U.; PYOCK, C. - Functional correlates of dopamine neurotransmission. **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften**. . ISSN 0036-7494. 30:1–3 (1974).

VOLPE, G. *et al.* - In vivo continuous monitoring of L-lactate coupling subcutaneous microdialysis and an electrochemical biocell. **Sensors and Actuators: B. Chemical**. . ISSN 09254005. 24:1–3 (1995) 138–141. doi: 10.1016/0925-4005(95)85029-5.

WATSON, Christopher J.; VENTON, B. Jill; KENNEDY, Robert T. - In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling. **Analytical Chemistry**. . ISSN 00032700. 78:5 (2006). doi: 10.1021/ac0693722.

WEISS, David J.; LUNTE, Craig E.; LUNTE, Susan M. - In vivo microdialysis as a tool for

monitoring pharmacokinetics. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**. . ISSN 0165-9936. 19:10 (2000) 606–616. doi: 10.1016/S0165-9936(00)00041-8.

WESTERHOUT, Joost *et al.* - Physiologically based pharmacokinetic modeling to investigate regional brain distribution kinetics in rats. **AAPS Journal**. . ISSN 15507416. 14:3 (2012). doi: 10.1208/s12248-012-9366-1.

WONG, Philip S. H. *et al.* - In vivo microdialysis/liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the on-line monitoring of melatonin in rat. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**. . ISSN 09514198. 13:5 (1999). doi: 10.1002/(SICI)1097-0231(19990315)13:5<407::AID-RCM500>3.0.CO;2-I.

ZAPATA, Agustin; CHEFER, Vladimir I.; SHIPPENBERG, Toni S. - Microdialysis in rodents. **Current Protocols in Neuroscience**. . ISSN 19348584. SUPPL. 47 (2009). doi: 10.1002/0471142301.NS0702S47.