



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Edna Pinto Valente

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Sofia Francisco da Silva e da Dra. Maria José Mações de Castro Torres Coelho e Monografia intitulada “Molecular Pharming: uma via alternativa para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico”, sob a orientação do Professor Doutor António Henrique da Silva Paranhos referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2023



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Edna Pinto Valente

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Sofia Francisco da Silva e da Dra. Maria José Mações de Castro Torres Coelho e Monografia intitulada “*Molecular Pharming*: uma via alternativa para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico”, sob a orientação do Professor Doutor António Henrique da Silva Paranhos referentes à Unidade Curricular “Estágio”, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

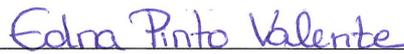
Setembro de 2023

Declaração

Eu, Edna Pinto Valente, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2018272849 declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “*Molecular Pharming*: uma via alternativa para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 8 de setembro de 2023



(Edna Pinto Valente)

Agradecimentos

À minha **Família**, em especial à minha mãe por todo o apoio e por acreditar sempre em mim, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Aos **Amigos**, os de sempre e aqueles que tive oportunidade de me cruzar ao longo destes 5 anos, em especial ao Leandro e à Joana pelo companheirismo, força e ajuda nos momentos de maior angústia. Obrigada por todos os momentos que vivemos.

Ao **Fábio**, pela paciência, compreensão e todo o apoio prestado ao longo deste percurso.

À minha casa nestes 5 anos, a todas as meninas da melhor ala da **Residência Polo III** por todas as conversas, entreaajuda e partilha de vivências. Um obrigado especial às minhas colegas de quarto, Catarina e Márcia, por todos os momentos e desabafos partilhados.

À minha madrinha **Andreia**, pela disponibilidade e conselhos.

Às minhas afilhadas **Adriana** e **Beatriz** por todos os jantares e conversas.

Ao **Professor Doutor António Henrique da Silva Paranhos**, por toda a dedicação, apoio e disponibilidade demonstrado no processo de escrita da monografia.

À **Dra. Ana Sofia Francisco da Silva** e toda a equipa do departamento de *Compliance* da Bluepharma[®] por esta oportunidade de estágio, pelo exemplo de espírito de equipa, profissionalismo e pelos conhecimentos transmitidos nesta área.

À **Dra. Maria José Mações de Castro Torres Coelho** e toda a equipa da Farmácia Central de Ovar, por todo o carinho, confiança e conhecimentos transmitidos.

A ti, **Coimbra**, por seres “casa” durante 5 anos e por todas as experiências que me permitiste viver.

A **todos** os que fizeram parte desta etapa, um obrigado.

“Capas, traçadas ao vento
Amigos e um momento
Que nunca esquecerei
Promessas que eu levo de um tempo
No adeus um sentimento
Que sempre guardarei”

Balada da Despedida 2022/2023

Grupo de Fado MAIO

Índice

Parte I – Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Lista de siglas e acrónimos	9
Resumo	10
Abstract	10
1. Introdução	11
2. Bluepharma – Indústria Farmacêutica, S.A.	11
3. Análise SWOT.....	12
3.1. Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>).....	12
3.1.1. Receção e Acolhimento	12
3.1.2. Cedência de Material e Equipamento de Trabalho.....	13
3.1.3. Integração na Equipa	13
3.1.4. Plano de Estágio	13
3.1.5. Autonomia e Confiança nas tarefas executadas	16
3.1.6. Subsídio de Alimentação.....	17
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>)	17
3.2.1. Duração do Estágio.....	17
3.2.2. Dificuldade de compreensão através da comunicação por siglas	17
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>).....	18
3.3.1. Metodologia <i>Kaizen</i>	18
3.3.2. Plano de Formação.....	18
3.3.3. Experiência curricular em Indústria Farmacêutica	18
3.3.4. Desenvolvimento de <i>soft skills</i>	19
3.3.5. Teletrabalho.....	19
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>)	19
3.4.1. Crescente exigência regulamentar e requisitos de qualidade	19
4. Conclusão.....	20
5. Bibliografia	21
Anexo	23

Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de siglas e acrónimos	25
Resumo	26
Abstract	26
1. Introdução	27
2. Farmácia Central de Ovar.....	27
3. Análise SWOT.....	28
3.1. Pontos Fortes (<i>Strenghts</i>).....	28
3.1.1. Integração na Equipa	28
3.1.2. Serviços prestados na farmácia.....	28
3.1.3. Plano de Estágio	29
3.1.4. Novo Módulo de Atendimento do Sifarma®	32
3.2. Pontos Fracos (<i>Weaknesses</i>).....	32
3.2.1. Aconselhamento em algumas áreas	32

3.2.2. Dificuldade na associação entre nomes comerciais e denominação comum internacional (DCI)	33
3.3. Oportunidades (<i>Opportunities</i>)	33
3.3.1. Metodologia <i>Kaizen</i>	33
3.3.2. Formações Internas	33
3.3.3. Realização de um Rastreamento Cardiovascular	34
3.3.4. Realização de uma atividade “Doutora Brinquedos”	34
3.3.5. Realização de um Passatempo sobre Proteção Solar	34
3.3.6. Auditoria Interna e Externa	35
3.3.7. Dispensa de Medicação Hospitalar	35
3.4. Ameaças (<i>Threats</i>)	35
3.4.1. Medicamentos Esgotados	35
3.4.2. Locais de venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica	36
4. Casos Práticos	36
5. Conclusão	40
6. Bibliografia	42
Anexo	44

Parte III – Monografia “*Molecular Pharming*: uma via alternativa para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico”

Lista de siglas e acrônimos	46
Resumo	47
Abstract	47
1. Introdução	49
2. <i>Molecular Pharming</i>	50
3. Principais Sistemas de Expressão de Proteínas Recombinantes em Plantas Transgênicas	51
3.1. Expressão Estável	52
3.1.1. Transformação nuclear	52
3.1.2. Transformação de cloroplastos	53
3.2. Expressão Transitória	54
3.2.1. Vetores virais	54
3.2.2. Agroinfiltração	55
3.3. Expressão em células cultivadas (suspensões celulares)	55
4. Sistemas de expressão em Plantas Transgênicas vs. Sistemas de expressão Convencionais	56
5. Vacinas Comestíveis	57
5.1. Mucosa Gastrointestinal	58
5.2. Mecanismo de Ação	59
5.3. Vacinas Comestíveis candidatas	61
5.3.1. Vírus da Hepatite B	61
5.3.2. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)	64
6. Vacinas de partículas pseudovirais	67
6.1. Mecanismo de Ação	68
6.2. Vacinas de partículas pseudovirais candidatas	69
6.2.1. Vírus <i>Influenza</i>	69

6.2.2. Vírus SARS-CoV-2.....	71
7. Vantagens, Limitações e Riscos: Vacinas Comestíveis, Vacinas de Partículas pseudovirais e Vacinas Convencionais.....	73
8. Desafios das vacinas à base de plantas: regulamentação, ambiente e ética	76
9. Conclusão e Perspetivas Futuras.....	78
10. Bibliografia	80

Parte I

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica **Unidade Qualidade, Compliance e Regulamentar** **Departamento de *Compliance***



Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A.

Estágio orientado pela
Dra. Ana Sofia Francisco da Silva

Lista de Abreviaturas

AIM – Autorização de Introdução no Mercado

API(s) – *Active Pharmaceutical Ingredient(s)*

BLPH – Bluepharma - Indústria Farmacêutica, S.A.

CHMP – *Committee for Medicinal Products for Human Use*

CMDH – *Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures – Human*

CoA(s) – *Certificate(s) of Analysis*

CoS/CEPs – *Certificates of Suitability*

DMFs/ASMFs – *Drug Master Files/Active substance Master files*

EMA – *European Medicines Agency*

FDA – *Food and Drug Administration*

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

IF – Indústria Farmacêutica

MBR – *Manufacturing Batch Record*

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PA – Produto Acabado

RA – Risk Assessment

SOPs – *Standard Operating Procedures*

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

TAIM – Titular de Autorização de Introdução no Mercado

UC(s) – Unidade(s) curricular(es)

US – *United States*

Resumo

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporciona aos estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a realização de um Estágio Curricular, no final do 5º ano, numa área do medicamento, nomeadamente Indústria Farmacêutica, para que possam concluir o ciclo de estudos com um maior aporte de valências fulcrais e um maior contacto com a realidade profissional.

O presente relatório contempla uma análise SWOT, com o objetivo de analisar e demonstrar o meu percurso na empresa, durante o meu estágio em Indústria Farmacêutica, no departamento de *Compliance* na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., entre 9 de janeiro e 31 de março de 2023.

Palavras-chaves: Indústria Farmacêutica, *Compliance*, Análise SWOT, Autorização de Introdução no Mercado.

Abstract

The Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra provides students of the Integrated Master's Degree in Pharmaceutical Sciences, a Curriculum Internship, at the end of the 5th year, in an area of medicine, namely the Pharmaceutical Industry, so that they can complete the cycle of studies with a greater contribution of core skills and greater contact with professional reality.

This report includes a SWOT analysis, with the aim of analyzing and demonstrating my experience in the company during my internship in the Pharmaceutical Industry, in the Compliance department at Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., between January 9th and March 31st, 2023.

Keywords: Pharmaceutical Industry, *Compliance*, SWOT Analysis, Marketing Authorization.

I. Introdução

O Farmacêutico é especialista do medicamento e está presente em todo o ciclo de vida do mesmo. Ciente desta responsabilidade, a Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) abrange um plano de estudos rico e diversificado em Unidades Curriculares (UCs) de excelência. Posto isto, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) oferece uma variedade de saídas profissionais, sendo uma delas a Indústria Farmacêutica (IF).

Deste modo, a FFUC possibilita a realização de dois estágios curriculares na conclusão do MICF, sendo um deles obrigatoriamente em Farmácia Comunitária e o outro em entidades externas. Durante a minha formação académica, fui adquirindo uma elevada curiosidade e interesse pela Área Regulamentar do Medicamento ao frequentar UCs como “Assuntos Regulamentares” e “Gestão de Processos Regulamentares”. Em função disso, decidi realizar o meu primeiro estágio em IF, nomeadamente na Bluepharma®.

Após submeter a minha candidatura, seguida de entrevista e posterior seleção, foi-me concedida a oportunidade de estagiar na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., de 9 de janeiro a 31 de março, no Departamento de *Compliance*, em regime misto (presencial e teletrabalho), sob a orientação da Dra. Ana Sofia Francisco da Silva e tutela da Dra. Carolina Simão Almeida.

O presente relatório de estágio é constituído por uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) onde se encontram mencionados os fatores internos (Pontos Fortes e Fracos) e os fatores externos (Oportunidades e Ameaças) com o qual me confrontei ao longo dos 3 meses de aprendizagem e experiência na Bluepharma®.

2. Bluepharma – Indústria Farmacêutica, S.A.

A Bluepharma® é uma indústria farmacêutica portuguesa que foi fundada em 2001, com sede em São Martinho do Bispo, Coimbra¹. Atualmente, o Grupo Bluepharma é constituído por 20 empresas inovadoras localizadas em diversos pontos do globo que atuam em toda a cadeia de valor do medicamento, destacando-se na investigação, produção, registo de medicamentos e comercialização de medicamentos genéricos^{1,2}. Com cerca de 89% de exportação dos seus produtos, a Bluepharma® está presente em mais de 40 países, tendo uma forte presença nos mercados europeus, africanos, nomeadamente Angola e Moçambique e nos Estados Unidos da América¹.

“Com os olhos postos no futuro”, a Bluepharma® tem alcançado altos padrões de qualidade e excelência dos seus medicamentos. Como tal, torna-se marcante realçar a inauguração da nova unidade industrial de produção de fórmulas orais potentes,

particularmente na área de oncologia, em Eiras, no dia 1 de março, no âmbito do projeto “Bluepharma Acelera 2030”³. Este projeto representa a convicção da Bluepharma® em se reafirmar a nível mundial como uma empresa ativa na produção de “novos produtos mais complexos, sofisticados e com um maior grau de inovação”³.

2.1. Departamento de Compliance

O Departamento *Compliance* surgiu em 2020, após uma reestruturação do organograma da empresa. Este departamento integra a Unidade de Qualidade, *Compliance* e Regulamentar da Bluepharma Indústria, S.A., sendo formada por uma equipa de colaboradores que anteriormente pertenciam ao departamento de Assuntos Regulamentares e ao antigo departamento da Qualidade do Produto e *Compliance*. O departamento de *Compliance* gere o ciclo de vida do medicamento após aprovação da Autorização de Introdução no Mercado (AIM), garantindo que todas as atividades realizadas na empresa estão em conformidade com as normas orientadoras e legislação aplicável das Autoridades⁴.

O Departamento de *Compliance* subdivide-se em três equipas essenciais, mais concretamente a de *Compliance* do Produto, a da Documentação e a dos Materiais, tendo sido integrada na equipa de *Compliance* do Produto. As funções desempenhadas por esta equipa são a monitorização de *Certificates of Suitability* (CoS/CEPs) e *Drug Master Files* (DMFs), acompanhamento das *technology transfers*, avaliação do impacto regulamentar de qualquer mudança proposta, preparação, submissão e monitorização de alterações regulamentares, sobretudo preparação dos pacotes de alteração regulamentar e atualização das secções do dossiê de AIM, mantendo contacto com os clientes e Autoridades Competentes.

3. Análise SWOT

3.1. Pontos Fortes (Strengths)

3.1.1. Receção e Acolhimento

O primeiro dia de estágio iniciou com a receção na sede da Bluepharma®, em São Martinho do Bispo, ministrada pelo departamento dos Recursos Humanos. Foi proporcionado uma breve apresentação da organização da empresa e das funções gerais desempenhadas por cada departamento. No final da receção, foi atribuído um tutor a cada estagiário com o intuito de acolher e integrar no respetivo departamento. Numa fase inicial, a minha tutora apresentou-me aos meus colegas da equipa *Compliance* do Produto e mostrou-me alguns locais primordiais da empresa. Da parte da tarde, a minha orientadora fez-me uma contextualização

acerca do departamento de *Compliance*. Para além disso, tive o privilégio de assistir a uma sessão de acolhimento ministrada pelo Dr. Paulo Barradas Rebelo, presidente da Bluepharma®.

3.1.2. Cedência de Material e Equipamento de Trabalho

Após a apresentação pelos Recursos Humanos, foi cedido a cada estagiário material e equipamento de trabalho (cartão de acesso, mochila, computador portátil, rato, auscultadores, etc.). Esta cedência foi imprescindível para a minha rápida integração nas metodologias da Bluepharma® e execução das tarefas de forma mais segura, pois foi-me concedido acesso às formações *online*, conta do *e-mail* profissional e documentação oficial da empresa.

3.1.3. Integração na Equipa

No geral, o departamento *Compliance* é constituído por uma equipa jovem, hábil, profissional e com um elevado espírito de equipa. Desde o começo, mostraram-se bastante acolhedores e disponíveis para esclarecer qualquer dúvida, quer presencialmente, quer em teletrabalho, o que foi uma mais-valia para perceber e executar tarefas, permitindo-me desenvolver competências como capacidades comunicativas e inovadoras, espírito crítico, autonomia, responsabilidade e profissionalismo. Desde o início, foi notório a relação de cumplicidade profissional e interpessoal entre toda a equipa. Assim, a minha integração na mesma foi muito positiva e espontânea.

3.1.4. Plano de Estágio

A principal tarefa do estágio foi sobre a presença das nitrosaminas nos medicamentos de uso humano fabricados pela BLPH. Inicialmente, li documentação *United States (US)*, nomeadamente orientações emitidas pela Food and Drug Administration (FDA) destinadas às Indústrias Farmacêuticas enquanto fabricantes do produto acabado (PA) no que concerne ao controlo destas impurezas nos medicamentos humanos⁵. Também li documentação europeia presente na *European Medicines Agency (EMA)* e no *Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures – Human (CMDh)* acerca da presença das nitrosaminas nos medicamentos, nomeadamente, orientações e conselhos para os Titulares de Autorização de Mercado (TAIM), reuniões do *Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)*, atualizações e perguntas e respostas para os TAIM e/ou requerentes sobre os pareceres do CHMP^{6,7}. Para complementar, li alguns *Standard Operating Procedures (SOPs)* do departamento disponíveis no SharePoint® (sistema interno de partilha e armazenamento de dados), ao qual todos os colaboradores têm acesso à informação, desde que autorizados pelos

responsáveis de cada pasta no sistema. A leitura das SOPs e da documentação oficial foi crucial nas tarefas e conhecimento de termos utilizados pelos colegas.

As nitrosaminas são compostos químicos carcinogénicos que resultam de uma reação de nitrosação entre uma amina primária, secundária ou terciária e ácido nitroso. Foram inicialmente detetadas nos medicamentos sartans, em meados de 2018, mas atualmente estão presentes em muitos outros medicamentos⁶. Por orientação da EMA e CMDh, estas impurezas passaram a ser controladas pelos TAIM, tanto no *Active Pharmaceutical Ingredient* (API) onde terá origem, como também comprovar que não irão surgir no PA, pois para além da síntese de API, existem outros processos de fabrico do PA que poderão aumentar a probabilidade de ocorrência destas impurezas no medicamento^{6,7}. Como tal, a BLPH enquanto TAIM de alguns dossiês de AIM e fabricante do PA, tem a responsabilidade de avaliar a presença de nitrosaminas nos medicamentos do seu portfólio e tomar as devidas ações de minimização de risco. Para isso, necessita de realizar uma avaliação de risco no PA em três passos sequenciais:

- “STEP 1: Risk Evaluation”⁶ – a BLPH realiza uma avaliação de risco no PA através da realização de um *risk assessment* (RA) no produto semiacabado feito pela equipa de Qualidade, para identificar se o PA pode estar em risco de presença de nitrosaminas. Cabe ao TAIM informar a Autoridade Competente acerca do resultado da avaliação de risco através de um *template* de resposta dedicado presente na página da EMA e/ou CMDh.

- “STEP 2: Confirmatory Testing”⁶ – se o risco é identificado, de acordo com as orientações europeias, a BLPH enquanto TAIM deve realizar análises confirmatórias nos seus produtos, no sentido de refutar ou confirmar a presença das nitrosaminas no PA. Enquanto fabricante de PA, cabe aos próprios titulares, decidir se querem fazer a análise das nitrosaminas nos seus produtos independentemente do resultado do RA. A BLPH como não tem tecnologia de desenvolvimento e validação do método de análise das nitrosaminas, subcontrata um laboratório externo para executar essa atividade e realizar a análise representativa dos lotes de PA. Cabe à equipa de Controlo de Qualidade da BLPH emitir os certificados de análise (CoAs) dos lotes analisados.

- “STEP 3: Changes to the marketing authorization”⁶ – se a presença das nitrosaminas está confirmada, a BLPH deve implementar medidas eficazes para minimizar o risco, nomeadamente mudanças no processo de fabrico, através da submissão de uma alteração regulamentar. Nos casos em que a BLPH é apenas o fabricante de PA, cada titular decide se quer submeter uma alteração regulamentar a implementar no dossiê de AIM. Cabe à equipa Regulamentar da *Compliance*, enquanto gestor dos dossiês no pós-AIM, preparar o pacote de alterações ao dossiê para submeter às Autoridades e gerir todo o processo regulamentar até à aprovação, passando pelas respostas às *deficiency letters* das Autoridades. No momento da submissão da

alteração ao dossiê, consoante os dados obtidos nos testes do STEP 2, os TAIM podem propor às Autoridades a análise das nitrosaminas como análise dos lotes em rotina, *skip testing* ou omissão da introdução das nitrosaminas como parâmetro de especificação no PA. Nos medicamentos sartans, alguns titulares passaram a incluir as nitrosaminas como análise no PA. Neste âmbito, foi-me atribuída a tarefa de reunir toda a informação e esquematizá-la num Excel de partilha na pasta da *Compliance* no SharePoint®, acerca do ponto de situação dos *steps* (mencionados anteriormente) realizados para a avaliação de risco das nitrosaminas nos medicamentos sartans do portfólio BLPH, designadamente Candesartan, Candesartan HCTZ, Losartan, Losartan HCTZ, Irbesartan e Irbesartan HCTZ.

Na segunda fase do estágio, tive a oportunidade de acompanhar e colaborar noutras tarefas do grupo, particularmente na gestão e preparação de alterações *minor*, IA para mercado Europeu e Annual Report para mercado US. A Bluepharma® procura otimizar os seus procedimentos analíticos, assegurando elevados padrões de qualidade do produto e satisfazendo a necessidade dos clientes. Para alcançar esse objetivo, foi necessário submeter uma alteração tipo IA à Autoridade referente ao método analítico do produto Azitromicina fabricado na BLPH com vários clientes e registado em vários territórios mundialmente. Neste âmbito, realizei um levantamento de taxas regulamentares aplicáveis a esta alteração num ficheiro Excel, seguindo as *guidelines* das alterações de AIM da Comissão Europeia. Alterações *minor* tipo IA "Do and Tell" podem ser submetidas após implementação⁸. Também, reuni a informação necessária para a elaboração da secção IV - *Chemistry, manufacturing and controls changes* - do *Annual Report* da Abiraterona US 250 mg. Um *Annual Report* é um documento com todas as alterações *minor* que ocorreram durante um ano e que termina na data de aniversário do medicamento. O requerente deve apresentar anualmente o *Annual Report*, no prazo de 60 dias a contar da data de aniversário do medicamento (data de aprovação do *Abbreviated New Drug Applicant* junto da FDA)⁹. A informação a incluir nesta secção foi relativo aos *change controls*, *document change controls*, incluindo os que estão associados a fornecedores de matérias-primas e matérias de embalagem, documentação de fabrico, isto é, *manufacturing batch record* (MBR) e *packaging batch record* (PBR), especificações do material de embalagem, especificações e métodos de teste do API, dos excipientes e do PA e protocolos e relatórios de estudos de estabilidade. Um MBR é um documento onde estão compiladas instruções de fabrico e as fórmulas de cálculo de um dado produto para um determinado tamanho de lote. Em contrapartida, um PBR, é um documento onde estão compiladas as instruções de embalagem para um dado produto.

Mais adiante, com auxílio do Excel, efetuei um levantamento de impacto regulamentar no corpo da especificação e métodos analíticos de API que contêm CEPs e DMFs. Um CEP é

um certificado emitido pelo *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare* que atesta que a qualidade do API, fornecido por determinado fabricante, é devidamente controlada e a sua pureza química e microbiológica é garantida pelos testes que constam na Farmacopeia Europeia¹⁰. Esta tarefa foi-me destinada com vista ao planeamento de uma estratégia, para análise de API de CEP anterior com a nova revisão de CEP.

A BLPH enquanto fabricante de PA, é responsável por garantir a qualidade do API que utiliza nos seus fabricos. Assim, após receber lotes deste API do fabricante de API, a Bluepharma® realiza testes de controlo do mesmo, nomeadamente analisa os parâmetros de especificação e confronta com os resultados do fabricante de API, para confirmar a qualidade do API usado para fabrico do PA. De acordo com a *Good Manufacturing Practices (GMP)*, o fabricante de produto acabado pode aplicar *reduce testing*, ou seja, apenas um número reduzido de parâmetros de especificação das matérias-primas são testados, enquanto os restantes parâmetros são retirados do CoA do fabricante de API. Para adotar esta prática, a qualificação de fornecedor tem de estar assegurada e identificados os parâmetros críticos de qualidade. Esta estratégia pode ser adotada sem impacto regulamentar por estar assegurado o cumprimento da GMP, no entanto se o dossier de AIM referir uma periodicidade para análise de algum parâmetro será necessário submeter uma alteração regulamentar para eliminar a frequência de análise. Acompanhei o seguimento desta estratégia para um produto aprovado no mercado Europeu e a definição da estratégia regulamentar. Neste caso em particular, foi necessário submeter às Autoridades dos países com registo do dossiê de AIM aprovado, uma alteração tipo IB, para remover a informação do dossiê acerca do nível de testagem do API pelo fabricante do PA. Com este fim, realizei um levantamento de taxas regulamentares aplicáveis ao caso. As alterações tipo IB “*Tell and do*” têm de aguardar aprovação de cada autoridade competente para ser implementadas em cada dossier de AIM⁸.

Posteriormente, preparei e realizei uma apresentação a todos os meus colegas do departamento, via *Microsoft Teams*, sobre a informação mais recente presente na EMA e CMDh, acerca da presença das nitrosaminas nos medicamentos fabricados ou não pela BLPH. Esta tarefa foi bastante produtiva, porque tive a oportunidade atualizar os meus colegas acerca dos novos requisitos divulgados e aprimorar mais o meu conhecimento acerca deste assunto.

3.1.5. Autonomia e Confiança nas tarefas executadas

Durante o meu estágio, tive total confiança dos colegas do departamento de *Compliance* para realizar as funções que me foram atribuídas, como ditas anteriormente. Esta confiança depositada foi crucial para me sentir mais segura nas minhas habilidades e de forma autónoma

aplicar os conhecimentos adquiridos. A equipa esteve sempre disponível para esclarecer qualquer dúvida que fosse surgindo. Por conseguinte, adquiri competências profissionais e pensamento crítico para resolver problemas de forma autónoma e com sucesso.

3.1.6. Subsídio de Alimentação

Ao longo dos três meses de estágio, a Bluepharma® ofereceu a todos os estagiários um cartão refeições com um valor fixo mensal de Subsídio de Alimentação. Visto que o meu estágio foi realizado em modo híbrido (presencialmente e remotamente), foi-me dada a chance de consumir parte desse valor na cantina da empresa e o restante valor monetário ficaria disponível no cartão para ser gasto em bens alimentares. A atribuição do Subsídio de Alimentação foi uma iniciativa bastante satisfatória, não só por questões económicas, como também tive a chance de criar uma boa relação interpessoal e boas memórias com a equipa na cantina.

3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)

3.2.1. Duração do Estágio

Considero que três meses de estágio curricular em IF é um período muito curto para captar de forma minuciosa e precisa as competências da profissão farmacêutica neste setor, dado que não foi tempo suficiente para obter uma experiência profissional considerável. Na minha opinião, três meses de estágio resultou numa breve elucidação das atividades realizadas nos departamentos da empresa e as interações entre os mesmos. Além disso, no departamento de *Compliance* estão inerentes diversos conceitos e metodologias que durante este período de estágio não foi possível contactar.

3.2.2. Dificuldade de compreensão através da comunicação por siglas

Durante o primeiro mês de estágio, senti alguma dificuldade em compreender a comunicação por siglas entre os colegas do departamento. Na faculdade, na UC “Assuntos Regulamentares” foram dadas algumas noções de siglas utilizadas na área regulamentar do medicamento, tornando-se essencial neste contexto, porém escasso. Contudo, há medida que me ia inteirando sobre os assuntos a tratar dentro do departamento e com o apoio de toda a equipa, foi-se tornando mais fácil compreender a linguagem utilizada neste meio profissional.

3.3. Oportunidades (*Opportunities*)

3.3.1. Metodologia *Kaizen*

Na Bluepharma® está implementada a metodologia *Kaizen*, tendo como filosofia a melhoria contínua em cada departamento¹¹. Essa melhoria depreende-se a nível da produtividade, eficácia, segurança, redução de desperdícios e otimização de processos¹².

Posto isto, o departamento de *Compliance* reúne-se diariamente para reuniões *Kaizen* de curta duração, onde toda a equipa expõe as comunicações que considera relevantes e que possam afetar o trabalho da equipa. A seguir, é abordado o plano de trabalho, a fim de toda a equipa estar atualizada acerca do trabalho desenvolvido por todos os colaboradores, por último, são debatidos os problemas e lições aprendidas.

Através destas reuniões internas, tive a oportunidade de acompanhar as atividades e tarefas diárias desenvolvidas no departamento. Em simultâneo, adquiri conhecimentos e coloquei em prática conceitos assimilados na Faculdade.

3.3.2. Plano de Formação

A Bluepharma® aposta na formação contínua dos seus colaboradores, para que estes adquiriram competências e conhecimento que possam aplicar no exercício das suas funções.

Ao longo da primeira semana de estágio, assisti formações *online* transversais a todos os departamentos e das quais saliento: “VEEVA Vault”, “Assuntos Regulamentares”, “SGI: Qualidade e GMP”, “Melhoria Contínua”, “Farmacovigilância” e “Ambiente, Segurança e Saúde no Trabalho”, que foram vitais para conhecer o funcionamento e a política da empresa. Paralelamente, foram ministradas formações pelos meus colegas do departamento, direcionadas para a área da Regulamentação e *Compliance*. Estas foram cruciais para consolidar conceitos já adquiridos e aumentar o meu conhecimento em contexto profissional.

3.3.3. Experiência curricular em Indústria Farmacêutica

O estágio curricular espelha o primeiro contacto com a realidade profissional da Indústria Farmacêutica, permitindo a aplicação dos conhecimentos e ferramentas de pesquisa obtidos durante o percurso académico. Neste sentido, a aprendizagem adquirida a nível de procedimentos de registo e requisitos europeus em UCs como “Assuntos Regulamentares” e “Gestão de Processos Regulamentares” foram bastante úteis. Contudo, a elaboração do Annual Report para a FDA, possibilitou-me aprender um pouco sobre a regulamentação americana. De forma sucinta, durante o meu período na empresa aprendi algumas das valências que o farmacêutico pode colocar em prática na Indústria. Assim sendo, toda a

aquisição e solidificação de conceitos ao longo do estágio surge como uma oportunidade de me vir a tornar uma farmacêutica versátil, e diferenciada no futuro profissional.

3.3.4. Desenvolvimento de *soft skills*

Durante o estágio, realizei as atividades que me foram destinadas com o auxílio do *Microsoft Word*, *Microsoft Excel* e *PowerPoint*. Para desempenhar essas funções, tive de consultar, vários ficheiros Excel presentes no SharePoint® da Bluepharma®, o que permitiu cimentar as minhas capacidades de utilização deste software e interpretar toda a informação organizada e sistematizada nesses ficheiros. Esta consulta foi fundamental para a elaboração dos Excel mencionados em 3.1.4., do *Annual Report* em *Microsoft Word* e da apresentação em *PowerPoint*.

Diariamente, o *Microsoft Teams* é uma ferramenta usada pela Bluepharma® para a realização de reuniões e chamadas entre os colaboradores da empresa e entre clientes e colaboradores. Adicionalmente, este *software* é uma excelente ferramenta de organização e datação das tarefas a realizar por cada colaborador, contribuindo para uma melhor organização de trabalho em equipa. Definitivamente, o meu conhecimento em relação ao *Microsoft Teams* era bastante restrito, porém este estágio deu-me a oportunidade de descobrir e dominar esta plataforma para realizar as minhas funções no quotidiano.

3.3.5. Teletrabalho

O estágio foi realizado em regime misto, sendo que me deslocava às instalações da empresa dois dias por semana e os restantes três dias ficava em teletrabalho a partir de casa. Esta estratégia foi adotada pelos colaboradores do departamento de *Compliance*, desde o surgimento da pandemia de COVID-19, a fim de minimizar o contacto no local de trabalho. Na minha opinião, realizar o estágio em modo híbrido foi uma mais-valia, visto que tanto tive a oportunidade de conhecer as instalações e o funcionamento da empresa, como tive a chance de me familiarizar com o *Microsoft Teams*, desenvolver capacidades e metodologias para assegurar a postura profissional mesmo trabalhando em casa e poupar longas deslocações às instalações da Bluepharma® ao trabalhar a partir de casa.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Crescente exigência regulamentar e requisitos de qualidade

No decorrer do estágio, deparei-me com uma crescente exigência nos parâmetros regulamentares e requisitos de qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos exigidos a todos os departamentos da Bluepharma®, em especial ao departamento de *Compliance*, pois é

o departamento responsável por pesquisar e fazer cumprir as novas alterações às normas e requisitos regulamentares, garantindo que todos os procedimentos e documentação cumprem com o exigido pelas Autoridades Regulamentares e clientes, para que não afete a libertação do lote do produto, devido a inconformidades. Para isto ser possível, tem de existir uma boa comunicação e alinhamento das tarefas executadas entre os diferentes departamentos e entre a empresa e os respetivos clientes e Autoridades Regulamentares. À vista disso, a *Compliance* tem um enorme envolvimento nas atividades de todos os setores da empresa, o que se reflete na elevada carga de reuniões e tarefas no dia a dia alocadas a este departamento.

4. Considerações Finais

Finalizei o meu estágio curricular na Bluepharma[®], consciente que o mesmo excedeu as minhas expectativas, foi muito gratificante, imprescindível e enriquecedor para o meu futuro profissional, dado que me permitiu aprofundar conhecimentos obtidos em MICEF, e adquirir novos sobre a IF, em particular na área regulamentar do medicamento. Além disso, proporcionou conhecer o ambiente industrial e o quanto o farmacêutico é fundamental neste ramo de constante evolução, ofereceu-me uma visão alargada das saídas profissionais que o farmacêutico pode ter neste setor. Por outro lado, este primeiro contacto com a IF, através do departamento de *Compliance*, não só despertou e aprimorou valências e competências como rigor, profissionalismo, espírito crítico, proatividade e diligência inerentes a esta área, mas ainda foram transmitidos valores como o trabalho em equipa e o espírito de ajuda que são a chave de qualquer sucesso empresarial e profissional.

Em suma, deixo um enorme agradecimento a toda a equipa de *Compliance* por todos os ensinamentos profissionais e pessoais, orientação e disponibilidade fornecidos durante o meu estágio. A todos, o meu mais genuíno “Obrigado”.

5. Bibliografia

1. BLUEPHARMA - **Empresa** [Consult. 21 fev. 2023]. Disponível em <http://www.bluepharmagroup.com/pt/sobre-nos/empresa>
2. BLUEPHARMA - **Bluepharma** [Consult. 21 fev. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharmagroup.com/pt>
3. BLUEPHARMA GENÉRICOS - **Bluepharma Acelera 2030** atual. 2020. [Consult. 21 fev. 2023]. Disponível em <https://www.bluepharmagenericos.pt/Noticia/214/bluepharma-acelera-2030>
4. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Compliance: Overview** [Consult. 24 fev. 2023]. Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/compliance-overview>
5. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs** atual. 2020. [Consult. 7 mar. 2020]. Disponível em www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs
6. EUROPEAN MEDICINES AGENCY - **Nitrosamine impurities** [Consult. 7 mar. 2023]. Disponível em <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>
7. CMDH - HEADS OF MEDICINES AGENCIES - **Nitrosamine impurities** [Consult. 7 mar. 2023]. Disponível em <https://www.hma.eu/human-medicines/cmdh/nitrosamine-impurities.html>
8. JORNAL OFICIAL DA UNIÃO EUROPEIA - COMISSÃO EUROPEIA - COMUNICAÇÕES DAS INSTITUIÇÕES, ÓRGÃOS E ORGANISMOS DA UNIÃO EUROPEIA. (2013) 1–79.
9. U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - **CFR - Code of Federal Regulations Title 21** atual. 2023. [Consult. 16 mar. 2023]. Disponível em <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm?fr=314.81>
10. EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES & HEALTHCARE - **Fact Sheet - Certification of Suitability** 2022. Acessível em [Fact Sheet - Certification of Suitability \(2022\)](https://www.edqm.eu/documents/52006/77108/Fact-sheet+Certification+procedure.pdf/738028e4-ab12-96b5-dfc4-fdc3505d0eaa?t=1635864720171). [Consult. 24 mar. 2023]. Disponível em <https://www.edqm.eu/documents/52006/77108/Fact-sheet+Certification+procedure.pdf/738028e4-ab12-96b5-dfc4-fdc3505d0eaa?t=1635864720171>
11. KAIZEN INSTITUTE - **What is KAIZEN™** [Consult. 26 mar. 2023]. Disponível em

<https://kaizen.com/what-is-kaizen/>

12. KAIZEN INSTITUTE - **Business Services** [Consult. 26 mar. 2023]. Disponível em <https://kaizen.com/industries/business-services/>

Anexo

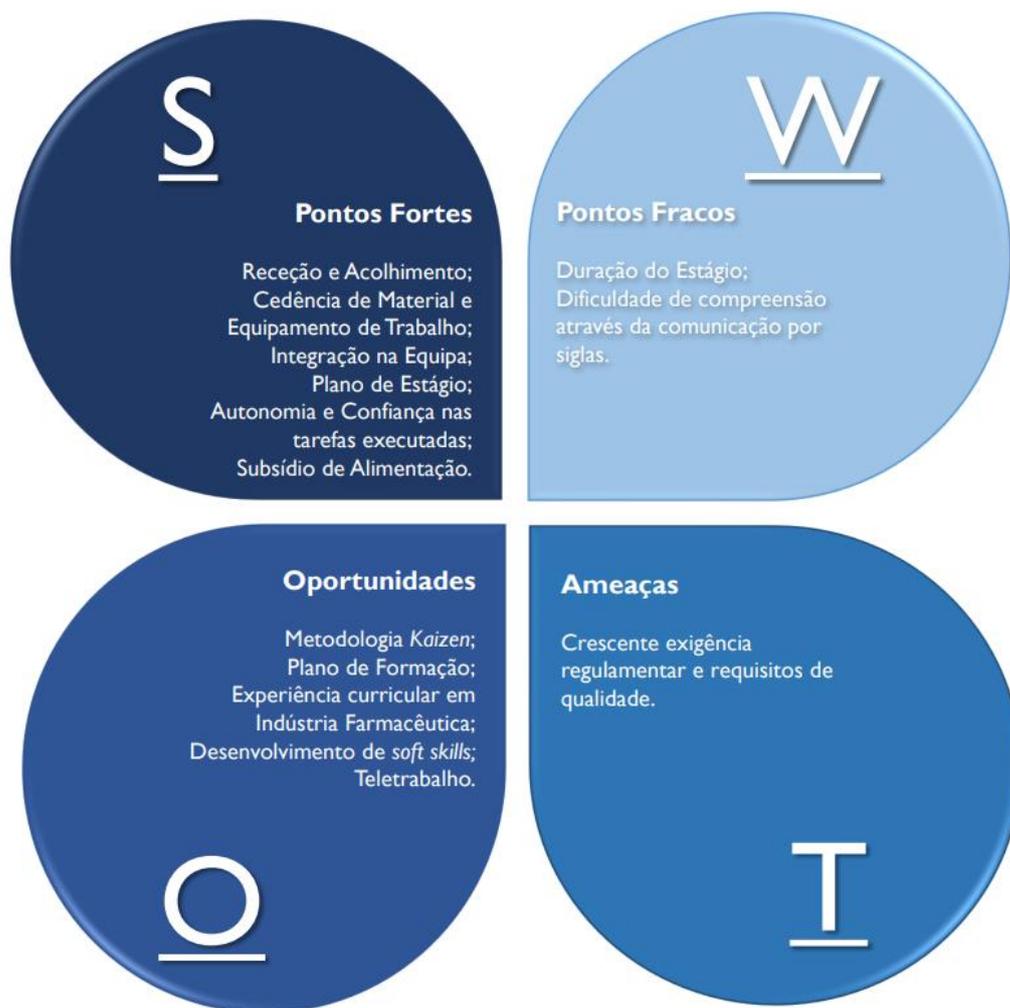


Figura I-I-A. Representação esquemática da análise SWOT do estágio realizado no departamento de Compliance na Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.

Parte II

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Central de Ovar



FARMÁCIA CENTRAL
O V A R

Estágio orientado pela
Dra. Maria José Mações de Castro Torres Coelho

Lista de siglas e acrónimos

ANF – Associação Nacional de Farmácias

DCI – Denominação Comum Internacional

EC – Estágio Curricular

FC – Farmácia Comunitária

FCO – Farmácia Central de Ovar

FOS – Frutooligossacarídeos

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MM – Medicamentos Manipulados

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

PV – Prazo de validade

SI – Sistema Informático

SWOT – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

Resumo

A Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra proporciona aos estudantes do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a realização de um Estágio Curricular de caráter obrigatório, no final do 5ºano, em Farmácia Comunitária, com a finalidade de consolidar e complementar os conhecimentos apreendidos durante a formação académica.

O presente relatório contempla uma análise SWOT, com o objetivo de analisar e demonstrar o meu percurso na farmácia, durante o meu estágio em Farmácia Comunitária, na Farmácia Central de Ovar, entre 3 de abril e 31 de julho de 2023.

Palavras-chaves: Farmácia Comunitária, Farmacêutico, Análise SWOT, Utente.

Abstract

The Faculty of Pharmacy of the University of Coimbra provides students of the Integrated Master's in Pharmaceutical Sciences, the realization of a Curricular Internship of mandatory character, at the end of the 5th year, in Community Pharmacy, with the aims of consolidating and complementing the knowledge learned during academic training.

This report includes a SWOT analysis with the aim of analyzing and demonstrating my experience in the pharmacy, during my internship in Community Pharmacy, at Farmácia Central de Ovar, between April 3rd and July 31st, 2023.

Keywords: Community Pharmacy, Pharmacist, SWOT Analysis, Patients.

I. Introdução

Nos últimos 10 anos, a atividade farmacêutica passou a focar-se mais no cidadão e não tanto no medicamento. Nos dias de hoje, o farmacêutico comunitário é, muitas vezes, o profissional de saúde de primeiro contacto com o utente, o que se traduz numa enorme responsabilidade no que concerne ao dever de atualizar os seus conhecimentos e possuir e aperfeiçoar as suas competências técnico-científicas, de forma a ter um papel ativo na promoção da saúde dos utentes, nomeadamente na promoção do uso racional do medicamento, do estilo de vida saudável e do incentivo à literacia em saúde, não se limitando apenas a dispensar medicamentos, distinguindo-se, deste modo, dos outros profissionais¹.

De modo a complementar e consolidar a formação teórica académica adquirida no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF), ministrado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, tive a oportunidade de realizar um estágio em farmácia comunitária, na Farmácia Central de Ovar (FCO), onde anteriormente tinha realizado um estágio de verão, sob orientação da Dra. Maria José Mações de Castro Torres Coelho. O Estágio Curricular (EC) na FCO decorreu entre 3 de abril e 31 de julho de 2023.

O presente relatório de estágio é constituído por uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) onde se encontram mencionados os fatores internos (pontos fortes e fracos) e os fatores externos (oportunidades e ameaças) com o qual me deparei ao longo da minha experiência, enquanto estagiária, na FCO.

2. Farmácia Central de Ovar

A Farmácia Central de Ovar (FCO) localiza-se na Rua Praça da República n.º 47, na localidade de Ovar², sendo propriedade da Dra. Maria José Coelho. Encontra-se instalada num local privilegiado, pois situa-se em frente à Câmara Municipal de Ovar e está relativamente próximo do Centro de Saúde USF João Semana e do Hospital Dr. Francisco Zagalo, o que permite uma enorme afluência de utentes com perfis distintos e de diferentes faixas etárias, desde jovens a idosos. Assim, tive a oportunidade de interagir com diversos tipos de utentes.

A equipa da FCO é uma equipa jovem, proativa, dinâmica e multidisciplinar com competências na área da saúde, beleza e bem-estar, com o compromisso de satisfazer os seus utentes pela prestação de um serviço de qualidade. A equipa é constituída por 7 farmacêuticos: a Dra. Maria José Coelho que também exerce funções de Diretora Técnica, a Dra. Catarina Catarina Andrade que é responsável pelo Sistema de Gestão de Qualidade e a Dra. Kathy Teixeira, ambas Farmacêuticas Adjuntas, a Dra. Paula Pinho, o Dr. Daniel Silva, a Dra. Rita Freitas e a Dra. Joana Almeida que é responsável pelo *marketing* e *merchandising*. A equipa

ainda conta com a Dra. Sara Coelho que é responsável pela Direção Geral de Planeamento e Gestão Financeira, o Dr. André Coelho, responsável pelo *marketing digital* e *e-commerce*, o António Rodrigues que desempenha a função de técnico de armazém e a Lucília Carriola, responsável pelo apoio e limpeza.

O horário de funcionamento da FCO é das 8h30 às 19h, de segunda a sexta-feira, e das 8h30 às 13h aos sábados, excluindo domingos e feriados. A farmácia realiza serviço permanente a cada 5 dias.

3. Análise SWOT

3.1. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.1.1. Integração na Equipa

A equipa técnica da FCO é dotada de um elevado profissionalismo, competência e ética, onde prevalece um enorme espírito de entreatajuda e companheirismo entre todos.

Desde o meu primeiro dia de estágio fui acolhida de forma excepcional. Diariamente, com boa disposição, foram-me transmitidos ensinamentos e padrões de exigência no trabalho executado, bem como valores como responsabilidade, autonomia e cooperação. A equipa sempre se demonstrou bastante recetível para esclarecer todas as minhas dúvidas e questões, ajudando-me nas tarefas propostas, fazendo-me sentir incluída na equipa e ganhar confiança e autonomia. O dinamismo contínuo presente na equipa permitiu-me desenvolver competências pessoais e profissionais como espírito crítico e inovação. Além disso, a exigência do trabalho em equipa na resolução de problemas de forma eficaz e precoce, permitiu-me desenvolver competências como comunicação, proatividade e relação interpessoal.

Deste modo, considero a integração na equipa um dos pontos mais positivos do EC.

3.1.2. Serviços prestados na farmácia

A FCO disponibiliza uma vasta gama de serviços de forma a responder às necessidades dos seus utentes e melhorar a sua qualidade de vida.

Na FCO é possível realizar um *Check-Up* de saúde gratuito que consiste nas medições de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, como pressão arterial, glicémia, colesterol e triglicéridos, com monitorização e aconselhamento para a prevenção da doença e suas complicações³. Adicionalmente, a FCO disponibiliza serviço de Dispensa Semanal da Medicação que consiste na preparação semanal da medicação do utente em blisters descartáveis, de acordo com a prescrição médica, tendo em conta os horários de toma e os

dias da semana. Este serviço destina-se a utentes polimedicados que não aderem à terapêutica por esquecimento frequente da toma e utentes que apresentem limitações físicas ou cognitivas, dificuldades de gestão da terapêutica ou com pouca autonomia para a realização das tarefas diárias³. Outros serviços disponíveis na farmácia são: administração de Injetáveis, preparação de Manipulados, serviço de Enfermagem, consultas de Nutrição e Podologia, Terapia da Fala, aconselhamento Homeopático, serviço de Maquilhagem, realização de testes rápidos de antigénio SARS-CoV-2, e, mais recentemente, consultas de Ayurveda. Para além disso, a FCO dispõe do Programa Troca de Seringas, dispensa de Medicamentos Hospitalares, serviço *pick-up* e entregas ao domicílio^{3,4,5}.

Enquanto estagiária, tive o incentivo e a oportunidade de me envolver ativamente em alguns destes serviços, colaborando nos registos necessários para a realização dos mesmos, o que definitivamente enriqueceu a minha experiência e permitiu-me ter uma perceção mais abrangente sobre a diversidade de tarefas na área de FC.

3.1.3. Plano de Estágio

Durante as duas primeiras semanas de estágio, as competências desenvolvidas foram maioritariamente a nível do *backoffice*, nomeadamente na gestão de encomendas e armazenamento de produtos. Neste período, sempre com a supervisão de um farmacêutico, tive o primeiro contacto com o *software* Sifarma 2000[®] e com o Novo Módulo de Atendimento do Sifarma[®], através da receção e verificação de encomendas diárias e instantâneas realizadas aos armazenistas, reposição de produtos e medicamentos no *robot* provenientes do atendimento, gestão de reservas e ainda gestão de devoluções aquando de discrepâncias na faturação, produtos com prazo de validade (PV) curto, produtos danificados e produtos não encomendados e faturados. Primeiramente, na receção das encomendas dos fornecedores, conferi a identificação de cada banheira e a conformidade com os dados das faturas. À medida que dava entrada das encomendas, aprendi a introduzir e a verificar o preço de venda ao armazenista, preço de venda ao público e os prazos de validade no sistema informático (SI). As restantes encomendas, que não são feitas aos distribuidores, são recebidas geralmente em caixas de cartão e acompanhadas com a fatura, sem calendário estipulado. A receção destas encomendas é feita pela criação de uma encomenda manual no SI onde estão listados os produtos encomendados para posteriormente serem recebidos. Além disso, participei em todo o sistema de gestão de reservas da FCO desde a sua receção, armazenamento e, mais tarde, estive envolvida na execução das reservas durante o atendimento ou por via telefónica.

Mensalmente, também executei o controlo das reservas pagas e contactei os utentes sobre o estado das suas reservas.

O armazenamento de produtos e medicamentos e reposição dos excedentes antes da fase de atendimento ao público contribuiu para ter uma melhor noção da localização dos mesmos na farmácia aquando da sua dispensa, reduzindo tempo na procura. Adicionalmente, tive a possibilidade de conhecer os medicamentos associando o nome comercial ao princípio ativo e as possíveis alternativas existentes, assim como familiarizar-me com a vasta gama de produtos na área dermocosmética, pluricultura, suplementos alimentares, entre outros. Tive, ainda, durante todo o período de estágio, o cuidado de armazenar e organizar todos os produtos da FCO de acordo como o método *First Expired, First Out*, isto é, o produto ou medicamento com o PV mais curto é o primeiro a ser vendido.

Particpei, também, no controlo dos prazos de validade dos produtos, através de uma listagem obtida pelo SI. Verifiquei o PV de cada produto e os *stocks* dos mesmos. Os produtos próximos do PV são separados dos restantes e podem ser devolvidos aos fornecedores, ou serem alvo de desconto com indicação do motivo do mesmo no atendimento, ou serem transferidos para uma prateleira do *backoffice* para destaque e alerta da equipa para a venda prioritária. Relativamente à gestão de *stocks*, foi durante o atendimento ao balcão, que detetei erros de *stock* ao qual procedi à anotação numa folha afixada no *backoffice* de modo que se proceda à sua correção assim que possível.

No decorrer do estágio, realizei a conferência do receituário e faturação. Isto tem como objetivo detetar a presença de erros na dispensa dos medicamentos que pode levar à perda de comparticipação da receita, resultando no não reembolso às farmácias das comparticipações. Assim sendo, tive a oportunidade de organizar e conferir as receitas e talões de faturação de acordo com o organismo de comparticipação, número de lote e número da receita dentro do lote e, ainda assisti a fechos mensais e à emissão de verbetes de identificação de lotes, relação resumos de lote e faturação final para cada entidade participante, sendo que são enviadas todas as receitas manuais e eletrónicas materializadas para o Centro de Conferência de Faturas, no caso dos medicamentos comparticipados pelo Sistema Nacional de Saúde ou para a Associação Nacional de Farmácias (ANF) no caso das comparticipações serem efetuadas por outros organismos complementares. A FCO também possui regimes de comparticipação locais onde é necessário efetuar o mesmo procedimento de conferência e envio da faturação às entidades.

Relativamente aos serviços farmacêuticos, tive a oportunidade de realizar o *Check-up* de saúde a cada utente que demonstrasse interesse, ajudando-me a conhecer a situação clínica do mesmo e a sua terapêutica medicamentosa, monitorizando corretamente os seus

parâmetros e prestando aconselhamento farmacêutico à luz dos conceitos aprendidos em MICF, intervindo sempre que necessário na ajuda à correta toma da terapêutica e nas dúvidas e receios dos utentes. Isto permitiu-me estabelecer diariamente uma relação mais próxima com os utentes. Em simultâneo, também preparei vários medicamentos manipulados (MM) para uso humano no laboratório da farmácia, segundo as Boas Práticas de Farmácia, inicialmente sob supervisão do Dr. Daniel, mas posteriormente de forma autónoma. Os MM preparados foram: pomada de enxofre a 6% (m/m), vaselina salicilada a 2% e 5% (m/m), solução oral de cloridrato de propanolol a 5 mg/mL e suspensão oral de trimetropim a 1% (m/v). Antes de iniciar a preparação de cada MM verifiquei sempre se a farmácia tinha as matérias-primas necessárias e dentro dos prazos de validade e, de seguida, procedi ao registo em computador de todos os dados acerca do MM, nomeadamente atribuição do número de lote (permite a rastreabilidade), preenchimento da ficha de preparação e registo do movimento das matérias-primas. Todos estes documentos são guardados na pasta de qualidade presente em todos os computadores da FCO. Após este passo, efetuei a preparação do MM, tendo sempre o cuidado de calibrar o equipamento a utilizar, se necessário. Por fim, fiz o seu acondicionamento e rotulagem com as devidas informações para o utente. Também realizei a preparação individualizada de medicamentos dos utentes aderentes a este serviço no laboratório da farmácia, de forma autónoma, recorrendo às suas prescrições médicas.

Concomitantemente, acompanhava alguns atendimentos, onde me era explicado o funcionamento do separador “Atendimento” do Novo Módulo de Atendimento do Sifarma®, pormenores a ter em atenção em possíveis situações a surgir, análise e avaliação da conformidade de uma receita médica e conselhos para um melhor atendimento ao utente. No final das duas primeiras semanas, iniciei o atendimento ao balcão, numa primeira instância com supervisão de um farmacêutico e depois de forma autónoma, mas sempre com o apoio de toda a equipa, caso necessitasse. Foi neste período que dispensei receitas eletrónicas e manuais e coloquei em prática os conhecimentos adquiridos no curso e os ensinamentos transmitidos pela equipa, ao nível do aconselhamento. Também tive a oportunidade de dispensar medicamentos psicotrópicos e estupefacientes e assistir à execução do controlo de receituários dos mesmos. Para além disso, colaborei no registo de administração de injetáveis realizado no SI, dispensei kits de trocas de seringas no âmbito do Programa Troca de Seringas e preparei medicação para o serviço pick-up e entregas ao domicílio, estabelecendo contacto com os utentes por via telefónica ou WhatsApp®, assegurando a correta e segura dispensa dos medicamentos.

A FCO é um ponto de recolha da Entidade Gestora do Sistema Integrado de Gestão de Resíduos de Embalagens e Medicamentos (VALORMED®), promovendo junto dos seus utentes

a entrega, recolha e gestão adequada dos resíduos, embalagens e medicamentos⁶. Enquanto estagiária, contactar com esta realidade foi muito satisfatório, pois fui verificando uma grande adesão dos utentes a este serviço. Porém, não pude deixar de sensibilizar alguns deles para a sua importância e contribuir para a adesão por parte dos mesmos a este serviço de recolha.

Em suma, este plano de estágio foi crucial para o meu êxito na obtenção de conhecimentos e habilidades.

3.1.4. Novo Módulo de Atendimento do Sifarma[®]

Ao longo do meu EC, o Novo Módulo de Atendimento do Sifarma[®] mostrou ser benéfico, pois as ferramentas deste *software* ajudaram-me na realização de atendimentos mais completos e eficazes. Muitas vezes, os utentes deslocavam-se à farmácia para adquirir a sua medicação crónica, mas, por diversas razões, não se faziam acompanhar pelas respetivas receitas médicas, pelo que pediam para lhes fazer uma venda suspensa. O facto de serem clientes habituais e terem ficha de utente na FCO, permitiu-me aceder facilmente ao seu histórico de compras e consultar quais os medicamentos e as dosagens que toma e o laboratório habitual, que é tido em conta para evitar confusão, principalmente nos utentes idosos que distinguem os medicamentos pela caixa. Adicionalmente, a consulta do seu histórico de compras permite avaliar a adesão à terapêutica pela comparação da data da última compra.

Em simultâneo, este *software* é imprescindível no aconselhamento de produtos de venda livre, na consulta de informação técnico-científica dos mesmos e na prevenção de possíveis interações medicamentosas.

3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)

3.2.1. Aconselhamento em algumas áreas

No decorrer do EC, tive algumas dificuldades no aconselhamento de produtos cosméticos, devido à grande variedade de marcas e gamas existentes no mercado, o que dificulta a seleção do produto. Ademais, também tive dificuldade em tentar explicar as diferenças entre produtos semelhantes de marcas diferentes. O mesmo aconteceu nos produtos veterinários, ao qual senti que não foram abordados de todo durante o curso. Além disso, na área dos suplementos alimentares, por vezes, senti algumas dificuldades na explicação ao utente acerca da função de cada componente presente num determinado suplemento.

Contudo, para superar estas dificuldades, tive formações em algumas marcas e produtos vendidos pela FCO e o apoio de toda a equipa, que foram fundamentais, posteriormente, no meu aconselhamento.

3.2.2. Dificuldade na associação entre nomes comerciais e denominação comum internacional (DCI)

Um dos obstáculos que me surgiu no EC, foi, muitas vezes, associar os nomes comerciais aos princípios ativos, principalmente nos casos em que os utentes não têm a certeza da medicação que fazem, distinguindo apenas pela patologia associada ou pela cor das embalagens, ou ainda nos casos dos utentes que mencionavam uma determinada marca e pediam aconselhamento farmacêutico. Porém, com a experiência, aprendizagem diária, conhecimento do utente, trabalho de *backoffice* e auxílio do Novo Módulo de Atendimento do Sifarma® essas dificuldades foram superadas.

3.3. Oportunidades (Opportunities)

3.3.1. Metodologia Kaizen

A filosofia *Kaizen* está presente na FCO, através do modo de organização da equipa e de todos os espaços da farmácia, normalização do trabalho e melhoria dos processos. Também se encontra presente nas reuniões rápidas e mensais da qual fiz parte. Este encontro permite comunicar os objetivos mensais da farmácia, campanhas e atividades a serem realizadas, alguma alteração regulamentar e identificar possíveis problemas e definir estratégias de resolução para os mesmos. A integração nestas reuniões permitiu-me obter informação importante para melhorar o meu desempenho no atendimento ao balcão.

3.3.2. Formações Internas

Ao longo do EC, participei em algumas formações, a fim de recordar conceitos e adquirir novos conhecimentos sobre os produtos, refletindo-se num aconselhamento mais aperfeiçoado, completo e confiante dos mesmos ao utente, permitindo-me desenvolver técnicas de *cross-selling*. Durante este período, tive formação da marca CURAPROX®, destinada à comercialização de produtos de higiene oral, de produtos dermocosméticos da marca CAUDALIE® e do grupo Cosmética Ativa com as marcas VICKY®, LA ROCHE-POSAY®, CeraVe®, AVEENO®, cuidados capilares da DERCOS® e protetores solares da LA ROCHE-POSAY®. Em adição, também tive formação de produtos solares e pós-solares da marca BIODERMA® e do grupo Uriach acerca dos suplementos alimentares da marca

DRENASLIM® e DEPURALINA®. Para complementar, com a vinda periódica dos delegados de saúde à FCO, tive a possibilidade de conhecer e esclarecer qualquer dúvida de diferentes produtos presentes na FCO, dos quais saliento os produtos veterinários da marca FRONTPRO® e FRONTLINE® que tiveram bastante rotatividade durante o verão.

Em todas estas formações tive a oportunidade de conhecer os produtos de forma pormenorizada e relembrar as principais funções dos seus constituintes.

3.3.3. Realização de um Rastreio Cardiovascular

No Dia Mundial da Hipertensão, a FCO com o apoio dos Serviços Sociais da Câmara Municipal de Ovar realizou um rastreio cardiovascular à população vareira. Tive oportunidade de colaborar neste rastreio, através da medição do perímetro abdominal, do cálculo do Índice de Massa Corporal e dos parâmetros fisiológicos e químicos (pressão arterial, glicémia e colesterol) e, a partir dos quais, realizei o cálculo do risco cardiovascular (RCV), recorrendo à tabela SCORE. Além disso, informei os utentes dos diversos fatores que podem aumentar o RCV e quais as medidas não farmacológicas a adotar para não agravar esse risco, estando também presente no folheto que é dado ao utente onde estão juntamente os seus valores de medição. Esse folheto foi realizado por mim e pela minha colega de estágio.

3.3.4. Realização de uma atividade “Doutora Brinquedos”

No Dia Mundial da Criança, a FCO esteve presente na Escola Básica de São João, em Ovar, para realizar a atividade “Doutora Brinquedos” com crianças desde o 1º até ao 4º ano escolar. Previamente, as crianças trouxeram de casa um brinquedo que mimetizava o doente que iria a uma consulta no gabinete das Doutoradas Brinquedos. Eu e a minha colega de estágio participámos nesta atividade como doutoras. No final do atendimento, as crianças levavam consigo rebuçados a mimetizar a terapêutica do seu doente. Esta atividade foi bastante gratificante, no sentido em que pretendia-se desmitificar os medos e receios das crianças em ir ao médico e reforçar a higiene oral na toma dos rebuçados.

3.3.5. Realização de um Passatempo sobre Proteção Solar

No mês de julho, por minha iniciativa, realizei um passatempo sobre Proteção Solar nas redes sociais da farmácia, com o apoio da Dra. Joana. O passatempo consistia na entrega de um cabaz de produtos no Facebook® e Instagram® a quem ficasse em primeiro lugar num jogo de dez perguntas sobre a Proteção Solar realizado por mim e disponível nas redes sociais. Este passatempo teve como objetivo promover a literacia em proteção solar aos utentes e

seguidores da FCO. Em complemento, pelo número de participantes no passatempo, pude concluir que no Facebook® encontra-se presente o maior público da FCO.

3.3.6. Auditoria Interna e Externa

A FCO é uma farmácia certificada, o que acarreta que haja anualmente duas auditorias, uma interna e outra externa. As auditorias ocorrem no mês de março e no mês de abril. Dado a data de começo do meu estágio, apenas tive presente na auditoria externa realizada pela Associação Portuguesa de Certificação para revalidar o certificado de qualidade. Esta foi uma experiência muito enriquecedora, pois tive oportunidade de colaborar ativamente com a equipa no controlo da gestão da qualidade, auxiliando nos diversos serviços prestados, como gestão e controlo de reservas e organização do laboratório de manipulados, entre outros, aprendendo todo o processo de preparação para uma auditoria e a forma como ela é realizada.

3.3.7. Dispensa de Medicação Hospitalar

A FCO faz parte do projeto *Pharma2Care* desenvolvido pelo Centro Hospitalar Universitário de São João, em parceria com a Ordem dos Farmacêuticos e a ANF que consiste na dispensa em FC de medicamentos habitualmente dispensados nas farmácias hospitalares, de forma a evitar deslocações dos doentes apenas para levantamento da medicação⁷, assumindo assim o farmacêutico comunitário um papel essencial num serviço de maior proximidade, através da adesão dos doentes à terapêutica e do uso racional do medicamento. Durante o estágio, tive a possibilidade de dispensar um medicamento hospitalar com o apoio da Dra. Paula e compreender todo o processo de registo e dispensa desta medicação.

3.4. Ameaças (*Threats*)

3.4.1. Medicamentos Esgotados

A rutura de *stock*, a nível nacional, de vários medicamentos foi uma realidade bastante presente ao longo do estágio. Por vezes, este problema causava situações desconfortáveis, resultando na insatisfação do utente e possível diminuição da sua fidelização, mesmo depois de explicar que tal cenário se devia à escassez dos fornecedores ou do laboratório. Embora tentasse sempre solucionar o problema, sugerindo a troca de laboratório, contactando diretamente com o armazenista para confirmar o seu *stock*, na tentativa de puder encomendar algumas unidades caso possível ou, em último caso, cooperar com o médico prescriptor para uma opção alternativa, nem sempre era viável. Nestes casos, apenas podia sugerir para o

utente contactar a linha 1400 na tentativa de conseguir adquirir o medicamento e reserva do mesmo nas farmácias mais próximas de onde se encontrava, através do acesso aos *stocks*.

3.4.2. Locais de venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

Segundo o Decreto-Lei n.º 134/2005, de 16 de agosto, os Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) podem ser vendidos fora das farmácias, com a finalidade de aumentar a acessibilidade aos mesmos e aumentar os pontos de venda. A venda de MNSRM fora das farmácias encontra-se sob um regime de preços livre⁸. Por isso, estes locais ao comprarem em grandes quantidades conseguem maior flexibilidade de preços, concorrendo diretamente com os preços praticados nas farmácias. A facilidade de acesso a estes medicamentos, leva ao aumento dos casos de automedicação, que sem o acompanhamento e aconselhamento de um farmacêutico podem resultar num risco para a saúde do utente, podendo resultar no uso incorreto do medicamento em situação inadequada, levando ao agravamento de alguma patologia existente, manifestação de efeitos adversos ou a interações farmacológicas com outros medicamentos que toma. Devido a todos estes fatores, o aconselhamento farmacêutico é indispensável, pois o farmacêutico encontra-se devidamente qualificado para esse efeito, contrariamente aos colaboradores dessas superfícies.

Portanto, compete aos farmacêuticos e a nós, como futuros farmacêuticos, distinguirmo-nos perante os outros profissionais de saúde, de modo que o utente ganhe confiança e reconheça o valor da profissão farmacêutica.

4. Casos Práticos

Caso I: Conjuntivite alérgica

Um senhor com cerca de 40 anos dirigiu-se à farmácia com queixas de prurido ocular bilateral, vermelhidão nos dois olhos, ligeira secreção ocular, fotossensibilidade e pálpebras ligeiramente inchadas. Inicialmente, questionei o utente se era frequente apresentar esta sintomatologia e se a mesma ocorria sazonalmente, pelo que respondeu que sim. De seguida, perguntei se sentia ardor nos olhos e há quanto tempo estaria com estes sintomas, obtendo a resposta de que sentia os olhos doridos e os sintomas haviam surgido um dia antes. Após analisar os olhos do utente, observei que a secreção era ligeira, fina e aquosa, de coloração clara, descartando assim hipóteses de conjuntivite de origem viral e bacteriana. Dada a sintomatologia, a recorrência sazonal e o tipo de secreção ocular, percebi que se tratava de uma conjuntivite alérgica.

Deste modo, aconselhei e dispensei colírio Allergodil® 0,5 mg/mL, um anti-histamínico, cujo princípio ativo é cloridrato de azelastina, usado no tratamento e prevenção dos sintomas de conjuntivite sazonal e não-sazonal. Durante a dispensa, expliquei que a posologia recomendada era de uma gota em cada olho, uma vez de manhã e outra à noite. Em caso de não haver qualquer melhoria dos sintomas ou agravarem-se no período de dois dias após o início da toma, aconselhei que consultasse um médico especialista⁹. Juntamente com esta terapêutica, aconselhei algumas medidas não farmacológicas como a limpeza ocular com soro fisiológico estéril, aplicação de compressas frias para reduzir a vermelhidão, prurido e inchaço e minimizar o contacto com potenciais agentes alergénios como, por exemplo, pólenes, ácaros do pó e pelos de animais de estimação.

Caso 2: Diarreia Aguda

Uma senhora com 30 anos dirigiu-se à farmácia queixando-se com diarreia e pede algo que lhe resolva a situação o mais rápido possível, pois faltou ao emprego por esse motivo, mas no dia a seguir precisava de regressar obrigatoriamente.

Inicialmente, questionei a utente se tomava alguma medicação e se fez alguma viagem recentemente, ao qual ela esclarece que não. De seguida, perguntei há quanto tempo estava assim, se tinha outros sintomas (dor abdominal intensa, febre e presença de sangue ou pus nas fezes), se o número de dejeções foi igual ou superior a seis vezes por dia e se tinha diarreia noturna. A utente informa que a diarreia começou no dia anterior e responde que não às restantes questões.

Como medidas farmacológicas, aconselhei o Imodium® Rapid 2 mg comprimidos orodispersíveis, cujo princípio ativo é loperamida, um obstipante¹⁰. Aconselhei este obstipante com o objetivo de parar as dejeções frequentes, dando algum alívio à utente, visto que tinha de regressar ao emprego no dia a seguir. Durante a dispensa, expliquei que inicialmente devia de dissolver dois comprimidos na língua, sem água e, após cada ida à casa de banho com dejeções diarreicas, dissolver mais um comprimido na língua, não ultrapassando os oitos comprimidos por dia¹⁰. Em caso de não haver qualquer melhoria da diarreia no período de dois dias após o início da toma do medicamento, aconselhei que interrompesse a sua toma e consultasse um médico¹⁰. Para além disso, também aconselhei Atyflor Hydra+® 10 saquetas, constituído por sete estirpes de probióticos, prebióticos frutooligossacarídeos (FOS), sais minerais, açúcar e edulcorante, para repor a flora intestinal e ajudar na hidratação e reposição dos eletrólitos, minimizando risco de desidratação derivado das dejeções frequentes. Expliquei

que a posologia recomendada era 1 saqueta por dia, dissolvida em aproximadamente 200 mL de água, durante ou após as refeições¹¹.

Como medidas não farmacológicas, aconselhei reforçar a hidratação com a ingestão de água, infusões ou caldos sem gordura e tomar alguns cuidados alimentares como evitar alimentos ricos em fibras, gorduras e açúcares e diminuir a ingestão de álcool.

Passado duas semanas, a utente regressou à farmácia, agradecendo o aconselhamento fornecido, pois tinha, de facto, resolvido a sua condição.

Caso 3: Infecção Urinária

Uma senhora com cerca de 40 anos dirigiu-se à farmácia com uma receita do antibiótico Amoxicilina + Ácido Clavulânico 875 mg/125 mg, comprimidos revestidos por película, para o tratamento de uma infecção urinária. Ao dispensar este medicamento, a utente confessou que já se tornava recorrente este problema, solicitando ajuda para evitar ou minimizar o mesmo.

Inicialmente, questionei a utente quanto à preferência do laboratório do antibiótico ao qual respondeu que preferia genérico. Posto isto, dispensei Amoxicilina + Ácido Clavulânico Generis® 875 mg + 125 mg comprimidos revestidos por película, na posologia duas vezes ao dia até ao fim da embalagem, no início das refeições, com vista a diminuir o potencial de intolerância gastrointestinal e otimizar a absorção da Amoxicilina e Ácido Clavulânico. Este antibiótico é recomendado para infeções urinárias de origem bacteriana¹².

Devido à situação recorrente, aconselhei o suplemento alimentar Cistisil® 30 comprimidos, tomando um comprimido de 12 em 12h. Este suplemento contém Arando Vermelho (*Vaccinium macrocarpon*), Cavalinha (*Equisetum arvense*), Uva Ursina (*Arctostaphylos uva-ursi*) e FOS, destinado ao conforto urinário e contribui para o normal funcionamento da bexiga e do trato urinário¹³. O arando vermelho e a urva ursina são dois antissépticos muito usados em infeções urinárias recorrentes, como é o caso da utente. O arando americano previne infeções no trato urinário, devido aos constituintes protoantocianidinas que impedem a aderência das bactérias ao urotélio, favorecendo a ação dos antibióticos contra as infeções. Por outro lado, a uva ursina contém arbutina como seu principal constituinte, auxiliando com propriedades anti-inflamatórias e antibacterianas. A cavalinha é um diurético, favorecendo a eliminação de água e levando a um aumento da diurese, com o objetivo de remover as bactérias. Por fim, os FOS são prebióticos que ajudam a repor a flora das vias urinárias. Além disso, como medida de cuidado redobrado com a higiene íntima, aconselhei o LACTACYD® ÍNTIMO 200 mL constituído por ácido láctico que contribui para a regularizar o pH da flora

vaginal, respeitando o equilíbrio natural da zona íntima da utente, prevenindo o aparecimento de infeções urinárias futuras¹⁴.

Em suma, lembrei a utente para alguns cuidados a ter como aumentar a ingestão de água, não retardar o ato de urinar, ter cuidados redobrados de higiene, limpando a zona genital da frente para trás e ingerir alimentos ricos em vitamina C para proporcionar um meio ácido que é essencial para impedir a proliferação bacteriana.

Caso 4: Dermatite de contacto alérgica

Uma senhora com cerca de 50 anos dirigiu-se à farmácia, apresentando manchas avermelhadas e bolhas na zona do peito, queixando-se de ardor e prurido intenso.

Inicialmente, questionei se essa situação se devia a exposição solar ou contacto com alguma substância, à qual me respondeu que pensa que se devia a um creme novo que experimentou no dia anterior nessa zona.

Perante o descrito, verifiquei que se tratava de uma situação típica de alergia a cosméticos. Questionei a utente quanto à preferência do laboratório dos medicamentos a aconselhar, ao qual respondeu que preferia genérico.

Deste modo, aconselhei a toma de Cetirizina Aurobindo® 10 mg, cujo princípio ativo é dicloridrato de cetirizina, um anti-histamínico não sedativo usado para o alívio de sintomas de urticária. Expliquei que a posologia recomendada era um comprimido por dia durante o tempo necessário para as machas desaparecerem, normalmente até 10 dias¹⁵. Em simultâneo, também aconselhei o uso de Pandermil® 10 mg/g Creme 30 g, cujo princípio ativo é hidrocortisona, um corticosteroide de aplicação tópica usado no tratamento de diversas afeções da pele em adultos, tais como dermatite, reação a queimaduras solares ou picadas de inseto. É também utilizado em todos os casos em que esteja indicado o uso de um corticoide, tais como manifestações inflamatórias e de prurido provocadas por dermatoses. Expliquei que a posologia recomendada era aplicar duas a três vezes por dia nas áreas afetadas, até, no máximo, 7 dias. Em caso de não existir melhorias, aconselhei que consultasse o médico¹⁶.

Por fim, alertei para o facto de evitar o contacto com o creme.

Caso 5: Micose e Tosse Produtiva

Um senhor com 45 anos dirigiu-se à farmácia mostrando uma fotografia da sua virilha e queixando-se de prurido nessa zona, pedindo aconselhamento para esta situação incomodativa. De seguida, também se queixou de tosse com expetoração.

Primeiramente, analisei a fotografia, verificando que a virilha estava muito vermelha e irritada. Perante a sintomatologia, considerei que se tratava de uma micose, ou seja, uma infecção fúngica que atinge a pele. Em vista disso, aconselhei Betadine® 40 mg/mL espuma cutânea 500 mL, cujo princípio ativo é iodopovidona, um antisséptico que atua ao nível da desinfecção e higiene da pele e das mucosas, considerado como um adjuvante no tratamento ou profilaxia de micoses. Recomendei a lavagem da zona lesada com este produto e enxaguar bem com água¹⁷. Para o tratamento da micose, aconselhei Micolysin 10 mg/g creme 40 g, cujo princípio ativo é clotrimazol, um antifúngico usado no tratamento de micoses interdigitais causada por dermatófitos, dermatite das fraldas, candidíase vulvar e balânica e pitiríase versicolor. Expliquei que deveria aplicar o creme sobre as zonas afetadas e em camada fina duas a três vezes por dia, durante uma semana¹⁸. Reforcei ainda que, antes de cada aplicação do creme era fundamental lavar com Betadine® 40 mg/mL espuma cutânea com o propósito de limpar a pele, evitando consequências mais severas.

Relativamente à tosse produtiva, questionei há quanto tempo perdurava, ao qual me respondeu que já durava há três dias. De seguida, perguntei se piorava no período da noite e se tinha alguma doença crónica ou fazia alguma medicação, de modo a perceber se a mesma intensificava a tosse. O utente respondeu que a tosse piorava durante a noite e que tomava medicação para o colesterol. Perante todas as respostas, perguntei se apresentava mais algum sintoma, obtendo uma resposta negativa.

Diante do ocorrido, aconselhei Fluimucil® 600 mg comprimidos efervescentes, cujo princípio ativo é acetilcisteína, um expetorante. Expliquei que a posologia recomendada era 1 comprimido efervescente por dia, de preferência à noite, durante 5 a 10 dias. Não deixei de alertar para o facto de o volume das secreções poder aumentar no início do tratamento¹⁹.

Como medidas não farmacológicas, aconselhei a ingestão abundante de água, fazer inalação de vapores de água, manter o ambiente húmido, evitando o uso excessivo de ar condicionado e aquecedor, principalmente em ambientes fechados, pois estes secam muito o ar.

5. Conclusão

Estes quatro meses de estágio na FCO fizeram-me crescer a nível pessoal e profissional, ganhando e consolidando conhecimentos e competências indispensáveis para o meu futuro como futura farmacêutica. Foi um período marcante de aprendizagem que me permitiu conhecer o funcionamento deste setor, o significado do que é ser farmacêutico comunitário, quais as responsabilidades que esta profissão assume perante a comunidade e quais os desafios

diários e futuros a enfrentar. Acima de tudo, ser farmacêutico não é só ser especialista do medicamento, mas também é ser um bom ouvinte e saber escutar e satisfazer as necessidades dos utentes, contribuindo para a saúde e bem-estar dos mesmos.

No início do estágio, senti algumas dificuldades e inseguranças principalmente no atendimento ao público, devido ao receio de errar e não conseguir atender às necessidades dos utentes. Porém, com a ajuda de toda a equipa técnica, que sempre depositou confiança em mim, conclui o meu estágio com mais conhecimento e confiança nas tarefas a desempenhar.

Por esta razão, não posso deixar de agradecer à equipa da FCO e à Dra. Maria José Coelho por esta oportunidade de aprendizagem, pelo carinho, apoio constante e confiança depositada. O meu mais sincero “Obrigado”.

6. Bibliografia

1. REPÚBLICA, Diário - Regulamento n.º 1015/2021 [Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos] de 20 de dezembro de 2021. **Diário da República, 2ª série. N.º 244.** 2021) 143–159.
2. FARMÁCIA CENTRAL DE OVAR - **Farmácia** [Consult. 20 jun. 2023] Disponível em <https://farmaciacentralovar.pt/farmacia>.
3. FARMÁCIA CENTRAL DE OVAR - **Serviços** [Consult. 20 jun. 2023] Disponível em <https://farmaciacentralovar.pt/servicos>.
4. FARMÁCIA CENTRAL DE OVAR - **Pick-up** [Consult. 20 jun. 2023] Disponível em <https://farmaciacentralovar.pt/pickup>.
5. FARMÁCIA CENTRAL DE OVAR - **Entregas** [Consult. 20 jun. 2023] Disponível em <https://farmaciacentralovar.pt/entregas>.
6. VALORMED - **Quem somos** [Consult. 24 jun. 2023] Disponível em <https://valormed.pt/quem-somos/>.
7. CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DE SÃO JOÃO - **São João Farma2Care** [Consult. 10 jul. 2023] Disponível em <https://portal-chsj.min-saude.pt/pages/1053>.
8. MINISTÉRIO DA SAÚDE - **Decreto-Lei n.º 134/2005 de 16 de Agosto** [Consult. 10 jul. 2023] Disponível em <https://files.dre.pt/lis/2005/08/156a00/47634765.pdf>.
9. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Allergodil, 0,5 mg/ml, colírio, solução** [Consult. 15 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>.
10. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Imodium Rapid 2 mg comprimido orodispersível** [Consult. 15 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>.
11. GRUPO ITALFARMACO - **Atyflor Hydra+** [Em linha] [Consult. 15 jul. 2023] Disponível em WWW:<URL:<https://www.atyflor.pt/>.
12. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Amoxicilina + Ácido Clavulânico Generis 875 mg + 125 mg comprimidos revestidos por película** [Consult. 20 jul. 2023] <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
13. SILFARMA PLUS - **Cistisil** [Consult. 20 jul. 2023] Disponível em <https://silfarmaplus.pt/produto/cistisil/>

14. LACTACYD - **Lactacyd Íntimo** [Consult. 20 jul. 2023] Disponível em <https://www.lactacyd.pt/product/lactacydr-intimo>
15. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Cetirizina Aurobindo 10 mg comprimidos revestidos por película** [Consult. 20 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
16. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Pandermil 10 mg/g Creme** [Consult. 20 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/detalhes-medicamento.xhtml>
17. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Betadine 40 mg/ml espuma cutânea** [Consult. 22 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
18. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Micolysin 10 mg/g creme** [Consult. 22 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>
19. INFARMED - **Resumo das Características do Medicamento Fluimucil 600 mg Comprimidos efervescentes** [Consult. 22 jul. 2023] Disponível em <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/pesquisa-avancada.xhtml>

Anexo



Figura I-I-A. Representação esquemática da análise SWOT do estágio realizado em Farmácia Comunitária, na Farmácia Central de Ovar.

Parte III

Monografia

“*Molecular Pharming*: uma via alternativa para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico”

Orientada pelo

Professor Doutor António Henrique Silva Paranhos

Lista de siglas e acrónimos

APCs – Células Apresentadoras de Antígenos

AS03 – *Adjuvant System 03*

BCRs – Recetores das células B

CD – Células dendríticas

cGMP – *Current Good Manufacturing Practice*

CoVLP – Partícula semelhante ao coronavírus

GALT – Tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal

HA – Hemaglutinina

HBsAg – Antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IgA(s) – Imunoglobulina(s) A

IgG(s) – Imunoglobulina(s) G

M – *Microfold*

NA – Neuraminidase

Nef – *Negative regulatory factor*

OMS – Organização Mundial da Saúde

p24-Nef – fusão de proteína p24 com a proteína reguladora negativa Nef

PAMPs – Padrões moleculares associados a agentes patogénicos

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

PMF – *plant molecular farming*

rHBsAg – Antígeno recombinante de superfície do Vírus da Hepatite B

RRPs – Recetores de reconhecimento de padrões

T-DNA – DNA de transferência

Ti – *tumor inducing*

VHB – Vírus da Hepatite B

VLP(s) – Partícula(s) pseudoviral(is) (do inglês, *virus-like particle(s)*)

VNPs – Nanopartículas semelhantes a vírus

Resumo

Molecular Pharming é uma técnica de biotecnologia que envolve a produção de produtos biofarmacêuticos, entre os quais proteínas recombinantes de alto valor, utilizando plantas geneticamente modificadas. Nas últimas três décadas, esta tecnologia tem vindo a crescer e a avançar drasticamente no mercado das vacinas. Com este posicionamento, novas vacinas foram introduzidas para obviar os riscos e desvantagens das vacinas convencionais. Duas abordagens mais promissoras são o uso de vacinas comestíveis e vacinas de partículas semelhantes a vírus. Estes tipos de vacinas são preparações imunogénicas que contêm antígenos expressos por plantas transgénicas, que têm vindo a provar a sua eficácia na prevenção de doenças, inclusive contra o vírus da Hepatite B, vírus da Imunodeficiência Humana, vírus *Influenza* e vírus SARS-CoV-2, através de ensaios pré-clínicos e clínicos.

Ambas oferecem numerosas vantagens quando comparadas com as vacinas tradicionais, principalmente no que concerne ao seu custo de produção, segurança e escalabilidade. Contudo, estes imunizantes ainda enfrentam desafios complexos. A regulamentação, os riscos e limitações destas vacinas e as considerações éticas associadas ao uso de plantas transgénicas exigem um cuidado redobrado para garantir a qualidade, segurança, eficácia e aceitação das vacinas pela sociedade. No entanto, com pesquisa e desenvolvimento contínuo pelos investigadores, a produção de vacinas utilizando esta tecnologia inovadora apresenta um futuro promissor com potencial para enfrentar e responder a desafios de saúde pública.

Palavras-Chave: *Molecular Pharming*, Plantas Transgénicas, Vacinas Comestíveis, Vacinas VLPs, Regulamentação.

Abstract

Molecular Pharming is a biotechnology technique that involves the production of bio-pharmaceuticals products, including high-value recombinant proteins, using genetically modified plants. Over the last three decades, this technology has been growing and advancing significantly in the vaccine market. With this approach, new vaccines have been introduced to mitigate the risks and disadvantages of conventional vaccines. Two particularly promising approaches are the use of edible vaccines and virus-like particle vaccines. These types of

vaccines are immunogenic preparations containing antigens expressed by transgenic plants, which have been proving their effectiveness in preventing diseases, including against the Hepatitis B virus, Human Immunodeficiency virus, Influenza virus and SARS-CoV-2 virus, through pre-clinical and clinical trials.

Both offer numerous advantages when compared to traditional vaccines, particularly in terms of production cost, safety, and scalability. However, these immunizations still face complex challenges. The regulation, risks and limitations of these vaccines and the ethical considerations associated with the use of transgenic plants require extra care to ensure the quality, safety, efficacy, and societal acceptance of the vaccines. However, with continuous research and development by researchers, the production of vaccines using this innovative technology presents a promising future with the potential to address and respond to public health challenges.

Keywords: Molecular Pharming, Transgenic Plants, Edible Vaccines, VLP Vaccines, Regulation.

I. Introdução

Até meados de 1980, as Indústrias Farmacêuticas apenas focavam-se no desenvolvimento de vacinas humanas com manuseamento de vírus vivos em culturas de células de mamíferos^{1,2}. As manipulações de vacinas com estes vírus requerem elevados níveis de biossegurança e pessoal especializado. Além disso, outros problemas de segurança como a falha de inativação do vírus, leva à reversão da virulência do vírus. A contaminação das vacinas com vírus e bactérias estranhas também é uma condição preocupante^{1,3}.

Em 1982, foi desenvolvida a primeira proteína terapêutica recombinante, a insulina humana, através da tecnologia de DNA recombinante que, posteriormente, foi comercializada⁴. A partir deste marco histórico, os esforços das grandes Empresas Farmacêuticas foram direcionados para a investigação da produção de proteínas recombinantes em vacinas. Até que, em 1986 foi produzida a primeira vacina recombinante aprovada para uso humano, uma vacina de partículas semelhantes a vírus contra a hepatite B em células de leveduras, obtida através da tecnologia de DNA recombinante^{5,6}. Este sucesso abriu portas para o aumento de produção de proteínas recombinantes, juntamente com o aumento dos potenciais organismos a ser usados na produção de vacinas, tornando as modificações pós-tradução de proteínas farmacêuticas um tema com bastante importância⁴.

A produção de proteínas recombinantes em cultura de células envolve elevados custos, nomeadamente no manuseamento de equipamentos de utilização única, na necessidade de limpeza entre a produção de lotes e no uso de meios de cultura caros^{7,8}. Além disso, a produção em células mamíferas ocorre em escala limitada com crescimento lento^{7,9,10}. Apesar das bactérias poderem ser usadas para a produção em larga escala, são desprezadas como hospedeiros na produção de vacinas, pois possuem pouca capacidade de realizar modificações pós-tradução de proteínas, como N-glicosilação e são potenciais fontes de endotoxinas⁹. As leveduras são o melhor hospedeiro para as vacinas candidatas¹, mas realizam hiperglicosilação de proteínas. Esta modificação excessiva pode afetar a bioatividade da proteína^{9,11}.

Para colmatar todas estas desvantagens, a crescente procura por soluções inovadoras na produção de vacinas e o avanço da engenharia genética, vieram impulsionar o desenvolvimento de novas estratégias de imunização. Neste contexto, a tecnologia de *Molecular Pharming* - que envolve a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacêutico através do cultivo agrícola de plantas transgênicas - tem se destacado como alternativa promissora na produção de novas vacinas, como as vacinas comestíveis e as vacinas de partículas semelhantes a vírus, oferecendo vantagens únicas em relação às vacinas convencionais. A produção destas vacinas em plantas geneticamente modificadas permite o

desenvolvimento de vacinas mais eficazes, reduz os custos de produção e infraestruturas, diminui os riscos de potencial contaminação por agentes infecciosos humanos, pois nenhum agente patogénico humano se replica nas plantas, convertendo-as em biofábricas seguras e permite a produção agrícola em larga escala^{1,12}. Em simultâneo, a produção de vacinas nos variados sistemas de expressão de proteínas recombinantes em plantas, proporciona o uso de diferentes espécies de plantas, tecidos ou células, formas de cultivo e técnicas de expressão, o que pode influenciar no rendimento da proteína recombinante e nas modificações pós-tradução¹³.

Neste contexto, será abordada a técnica *Molecular Pharming* (traduzida por alguns autores como “Agricultura Molecular”), os principais sistemas de expressão de proteínas recombinantes em plantas transgénicas para a produção de vacinas com enfoque nas vacinas comestíveis e vacinas de partículas semelhantes a vírus. Além disso, também serão apresentados os mecanismos de ação, algumas vacinas candidatas, as vantagens e desvantagens e os riscos associados a ambas as vacinas. Por fim, será explorado os desafios regulamentares, ambientais e éticos enfrentados na utilização de vacinas à base de plantas.

2. *Molecular Pharming*

Nas últimas três décadas, as plantas tornaram-se biofábricas atraentes na produção de uma ampla variedade de biomoléculas com interesse farmacêutico e comercial, pois muitos cientistas descobriram os seus benefícios como biorreatores¹⁴⁻¹⁶. A produção de proteínas recombinantes, proteínas funcionais, enzimas industriais e metabolitos secundários em plantas são descritas como “*plant molecular farming*” (PMF). Estas são produzidas utilizando a engenharia genética para obter compostos específicos, especialmente proteínas recombinantes, que são extraídas e purificadas após colheita¹⁷.

As PMF são consideradas plataformas económicas e disponíveis de biofármacos, incluindo proteínas terapêuticas e vacinas¹⁷, que cresceram drasticamente nos últimos 20 anos¹⁸. Devido a fatores-chave como custo-benefício, escalabilidade, versatilidade, flexibilidade e robustez do sistema, estas plataformas à base de plantas são fomentadas a enfrentar os potenciais concorrentes para o sistema de expressão tradicional. Numerosos ensaios pré-clínicos e clínicos estão em andamento para a produção de vacinas à base de plantas, através da expressão de antígenos purificados em plantas hospedeiras¹⁹.

A planta *Nicotiana benthamiana* Domin, uma planta nativa da Austrália pertencente à Família *Solanaceae*²⁰, é a espécie vegetal mais usada na produção de vacinas à base de plantas, graças ao seu potencial de engenharia genética, ao baixo custo de produção e elevado

rendimento, que culminam numa escolha acessível a todos os centros de investigação encarregados por estes estudos. Em simultâneo, é o modelo de planta escolhido para o sistema de expressão transitório, por causa do seu rápido crescimento e ser suscetível à Agroinfiltração^{19,21,22}.

3. Principais Sistemas de Expressão de Proteínas Recombinantes em Plantas Transgênicas

As plantas transgênicas são obtidas através da inserção do(s) gene(s) pretendido(s) em plantas selecionadas que irão codificar as proteínas de interesse mediante integração prévia num vetor elegido. Após a introdução do gene no genoma da planta, as proteínas recombinantes são expressas por via sistema de transformação estável ou sistema de transformação transitória. A escolha do sistema de transformação depende da localização final do transgene na planta e da espécie hospedeira selecionada²³.

Atualmente, existem dois métodos de expressão estável mais utilizados para obter linhagens de plantas transgênicas: transformação nuclear (transferência genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*) e transformação de cloroplastos (método de bombardeamento com microprojéteis ou método biobalístico)^{3,19,23-25}.

Em relação à expressão transitória, os vetores virais e a agroinfiltração são os dois métodos mais comumente utilizados^{19,23}. Em alternativa, as proteínas também podem ser produzidas através da expressão em células cultivadas, sobretudo em suspensões celulares²³.

Outros métodos de engenharia genética como a eletroporação e a transformação de protoplastos caíram em desuso, devido ao desenvolvimento de outras técnicas mais eficientes²⁶.

A Figura 1, ilustra um esquema com as abordagens atualmente mais usadas na transformação de plantas para a produção de proteínas recombinantes farmacêuticas e não farmacêuticas¹⁹.

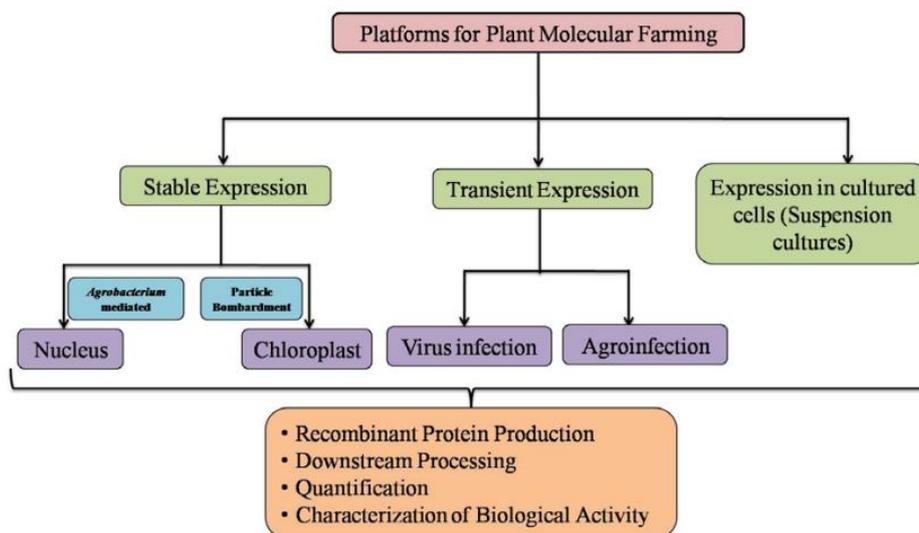


Figura 1. Visão geral das abordagens de transformação de plantas empregadas para a produção de proteínas recombinantes farmacêuticas e não farmacêuticas em plantas. (Retirado de ¹⁹)

3.1. Expressão Estável

Resulta na incorporação do gene no genoma da planta hospedeira com consequente alteração genética permanente da mesma²⁷. O gene é transmitido às gerações seguintes, através da reprodução sexuada (sementes) ou vegetativa (estacas de caule) da planta transgênica. Deste modo, as plantas tornam-se capazes de produzir e expressar a proteína recombinante de forma constante²⁸. A obtenção de plantas transgênicas por esta técnica requer muito tempo e recursos consideráveis, e a quantidade de proteína expressa é insuficiente para transpor para a produção a nível industrial. Apesar disso, a produção de proteína antigénica por este método pode ser usada no desenvolvimento de vacinas orais, como por exemplo, vacinas comestíveis, sendo vantajoso na redução dos custos inerentes à purificação de proteínas^{19,29}.

3.1.1. Transformação nuclear

A *A. tumefaciens* e a *Agrobacterium rhizogenes* são duas espécies de bactérias habitualmente usadas neste método³, no entanto a *A. rhizogenes* é adequada para a produção de culturas de raízes transgênicas²⁶. A *A. tumefaciens* é uma bactéria do solo da Família *Rhizobiaceae*^{30,31} que estabelece uma relação parasitária com espécies monocotiledóneas e dicotiledóneas, causando a doença da “galha da coroa” (*crown gall disease*, em inglês)^{26,32}. A bactéria infeta a planta após detetar as secretinas fenólicas libertadas por uma ferida ou incisão desta e transfere uma parte do seu DNA para a planta, onde é integrado no genoma da hospedeira, induzindo a produção de tumores e mudanças no metabolismo da planta^{23,31,32}.

Existem estudos que demonstram que os genes causadores da doença não advêm do nucleóide bacteriano, mas do plasmídeo, chamado plasmídeo Ti (*tumor inducing*) que contém um segmento de DNA, designado T-DNA (DNA de transferência) com capacidade tumorigênica^{23,25,33}. Beneficiando das características intrínsecas desta bactéria e uma vez selecionados os genes de interesse, procede-se à sua inserção, juntamente com um gene que confere resistência a um determinado antibiótico, no T-DNA do vetor de transferência com posterior transformação bacteriana, ou seja, incorporação do plasmídeo modificado na *A. tumefaciens*. De seguida, a bactéria infeta os tecidos vegetais transferindo o seu T-DNA para o núcleo das células dos tecidos vegetais e integrando-o no genoma da planta. Posteriormente, os tecidos vegetais são colocados em meio de cultura seletivo (contendo o antibiótico marcador), de modo a promover o crescimento das células transformadas e inibir o crescimento das células não transformadas. Este processo permite que as células transformadas se desenvolvam para plantas inteiras. As plantas que oferecem resistência ao antibiótico são consideradas como tendo incorporado o gene de interesse^{3,23-25}, todavia é necessário a análise dessas plantas remanescentes para confirmar a presença e a expressão do transgene nas mesmas, recorrendo-se para tal a técnicas como reação em cadeia de polimerase (PCR), sequenciamento de DNA ou ensaios de expressão gênica³⁴. Após confirmação, as plantas geneticamente modificadas podem ser cultivadas para a produção da proteína recombinante desejada, através da transcrição e tradução dos genes presentes no genoma da planta transgênica^{3,23-25}.

Este método de transformação é lento e apresenta um baixo rendimento de expressão proteica²⁴.

3.1.2. Transformação de cloroplastos

O método de transformação de cloroplastos é um método alternativo usado frequentemente quando não é viável e eficiente optar pela transformação nuclear²⁴. Esta técnica é menos dependente do genótipo e mais adequado para a transformação de plastos²⁶. Trata-se de uma abordagem de entrega direta do gene, intitulado também por método de bombardeamento com microprojéteis ou método biobalístico, pois não necessita de nenhum vetor para transferência do gene para a planta hospedeira⁸. Nesta técnica, ocorre a introdução direta do gene de interesse (DNA) no genoma circular do cloroplasto por intermédio de uma pistola de partículas, chamada *gen gun* que bombardeia partículas de metal²⁵. A sequência de DNA de interesse é precipitado em micropartículas de metais (ouro ou tungstênio) que são bombardeadas em alta velocidade pela *gen gun* em direção ao tecido vegetal eleito, utilizando

como força propulsora hélio comprimido^{3,23-25}. As micropartículas metálicas perfuram a parede celular vegetal e o DNA penetra no cloroplasto da célula e integra-se no seu genoma³³.

Esta alternativa oferece uma elevada entrega de diversos genes heterogêneos e permite a expressão de uma grande quantidade de proteínas recombinantes, resultante da presença de elevado número de cloroplastos e das diversas cópias cromossômicas que implica que existam inúmeras cópias de transgenes nas células, o que leva a altas taxas de expressão sem que haja o silenciamento de genes^{23,25,35-37}.

3.2. Expressão Transitória

Resulta na incorporação temporária do gene nas células vegetais sem integração estável no genoma da planta hospedeira^{12,38}. O gene é expresso apenas por um curto período de tempo e não é transmitido à descendência, logo as proteínas recombinantes desejadas são produzidas transitoriamente após o processo de transformação^{36,38}. Contrariamente à transformação estável, a transformação transitória foi desenvolvida para plantas transgênicas que expressam as proteínas recombinantes em elevada quantidade e de forma rápida, dentro de poucos dias^{19,35}.

3.2.1. Vetores virais

Este método usa vírus de plantas como vetores para a entrega e a expressão do gene de interesse²³. Certos vírus de plantas como os vírus do mosaico da ervilha, vírus do mosaico da alfafa, vírus do mosaico do tabaco, vírus do mosaico da couve-flor, vírus do tomate e vírus da batata são vírus considerados como não patogênicos para o homem que são modificados para expressar a proteína ou peptídeo pretendido^{3,16,23,39}. O vetor viral desses vírus é geneticamente modificado para conter o gene de interesse ligado a sequências promotoras, terminais, entre outras, para a expressão adequada do peptídeo. O vetor viral é introduzido na planta, infeta as células e começa a replicar-se. Durante a replicação viral intracelular, o gene é transcrito e traduzido para expressar temporariamente a proteína recombinante desejada. Além disso, podem ser sintetizados e acumulados epítopos com expressão na superfície do vírus, alterando as proteínas do capsídeo viral^{3,23,40}. Após alguns dias, a planta é colhida para recolha de amostras para avaliar a expressão do gene desejado, através de técnicas como reação em PCR, *Western blot*, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou análise de atividade enzimática, dependendo da proteína-alvo^{41,42}.

Esta abordagem apresenta uma expressão rápida e em larga escala de proteínas recombinantes na planta, mas estes peptídeos devem ser purificados das plantas infetadas antes

de serem formulados para a produção de vacinas. Ademais, esta técnica pode ocasionar morte das plantas transgênicas após a infecção, sendo necessário reinfecção de outra planta com o vírus. Portanto, este método teria de ser continuamente realizado para produzir vacinas^{35,43}. Por fim, a o tamanho do gene para inserção no vetor é limitado³⁵.

3.2.2. Agroinfiltração

A agroinfiltração envolve a introdução direta de uma suspensão de *A. tumefaciens* nas folhas da planta hospedeira,^{12,35}. O vetor bacteriano é modificado em laboratório, inserindo o gene de interesse no T-DNA do plasmídeo. Esse vetor contém os marcadores genéticos que são necessários para a identificar as células transformadas. Seguidamente, as plantas hospedeiras são preparadas: as folhas da planta hospedeira necessitam de sofrer alguns cortes para permitir a entrada da bactéria. Folhas jovens são preferidas devido à sua maior eficiência na transferência do vetor de expressão. Depois disso, as folhas das plantas ou são infiltradas sob vácuo, ou são imersas com uma suspensão diluída de *A. tumefaciens*, ou são injetadas com uma seringa contendo a suspensão diluída do microorganismo. A bactéria infeta as células vegetais e transfere o transgene de interesse do seu T-DNA para as mesmas^{12,35,44}. Após a infiltração, as plantas são mantidas em condições adequadas de crescimento, temperatura e humidade para permitir que a expressão de proteínas recombinantes ocorra por meio de transcrição e tradução do gene. A seguir, as folhas das plantas são colhidas e analisadas para confirmar a expressão do gene de interesse, através da técnica de PCR⁴⁴.

Esta abordagem é mais rápida e eficiente para expressar temporariamente os genes em plantas, sendo amplamente usada. Adicionalmente, este método tem a capacidade de expressar genes de tamanho maior, contudo as proteínas produzidas necessitam de ser purificadas após extração da planta^{12,35}.

3.3. Expressão em células cultivadas (suspensões celulares)

Este método é muito usado para o desenvolvimento de células geneticamente modificadas em grande escala^{19,23}. Primeiramente, as células da planta são transformadas geneticamente para conter o gene de interesse, por intermédio de métodos como a transferência genética mediada pela *A. tumefaciens*, o bombardeamento com microprojéteis ou a eletroporação. O gene de interesse é inserido nas células vegetais e incorporado no genoma da célula. Após a transformação genética, as células são colocadas em meio de cultura seletivo contendo antibiótico com o objetivo de selecionar as células transgênicas que contêm o marcador de seleção, neste caso, o gene de resistência ao antibiótico e eliminar as células não

transgênicas. À posteriori, as células transgênicas selecionadas são colocadas num meio de cultura contendo nutrientes necessários para promover o seu crescimento. Durante o processo, as células transgênicas proliferam e formam linhagens celulares transgênicas estáveis. Mais adiante, as células transgênicas estáveis são transferidas para um meio de cultura líquido, chamado meio de cultivo em suspensão celular, que contém os nutrientes imprescindíveis, como sais, vitaminas e açúcares, necessários para o crescimento das células vegetais. Durante esta etapa, as células vegetais expressam o gene de interesse para produzir a proteína recombinante pretendida. A expressão proteica pode ser controlada ao longo do tempo através de técnicas como *Western Blotting* ou ensaios enzimáticos. De seguida, as células transgênicas são cultivadas em biorreatores de grande escala onde podem produzir proteínas em quantidade suficiente. Quando as células geneticamente modificadas atingem o estadió de crescimento ideal e a quantidade de proteína recombinante expressa é a desejada, a cultura celular é recolhida por centrifugação ou filtração para separar as células do meio de cultura líquido. Por último, as células são processadas para a extração e purificação das proteínas recombinantes^{23,45}.

4. Sistemas de expressão em Plantas Transgênicas vs. Sistemas de expressão Convencionais

O uso de plataformas vegetais para a produção de proteínas recombinantes nas Indústrias Biofarmacêuticas apresenta uma maior viabilidade financeira do que os métodos standardizados, como plataformas de células animais ou microorganismos. Porém, estas apresentam dificuldades no processamento a jusante (*downstream*)¹³.

Sistemas de expressão de proteínas recombinantes para a produção de vacinas em plantas apresentam reduzidos custos de produção quando comparados com sistemas convencionais de expressão em mamíferos e bactérias^{18,36,46}. Os elevados custos dos biofármacos e vacinas atuais são resultantes dos complexos métodos de produção e distribuição, que incluem custos de sistemas de purificação e fermentação, bem como despesas adicionais com adjuvantes, armazenamento refrigerado, transporte e distribuição estéril^{18,36,47,48}. Para reduzir custos das instalações nas etapas iniciais de produção ou processamento a montante (*upstream processing*), fermentadores e biorreatores podem ser substituídos por salas de crescimento de plantas, estufas, cultivo de plantas em campo com contenção biológica adequada de genes estranhos, através de estratégias como herança materna ou esterilidade masculina, ou expressão de genes de interesse em tecidos vegetativos com colheita desses tecidos antes de gerar estruturas reprodutivas, sendo mais

economicamente rentáveis do que em culturas de células^{18,49,50}. Desta forma, elevada escalabilidade, e alta velocidade de produção são das vantagens mais importantes destas plataformas para controlar surtos pandêmicos⁵¹. No caso das vacinas orais e terapêuticas, como as vacinas comestíveis, os custos no processamento a jusante também são baixos. Logo, em vez de ocorrer purificação da proteína recombinante com elevado grau de pureza, os tecidos vegetais podem ser administrados por via oral sem qualquer custo^{3,14,36,52}.

Em contrapartida, para estes sistemas conseguirem alcançar altos níveis de expressão de proteínas, além de terem de ser fornecidos meios para obter um elevado rendimento do sistema de produção, também é necessário obter uma recuperação eficaz das proteínas recombinantes da planta hospedeira^{37,53}. As grandes limitações inerentes a estas plataformas de expressão proteica estão no processamento a jusante, nas etapas de extração e purificação, sendo causado pela fisiologia da planta. Em várias espécies de plantas, a expressão de proteínas recombinantes dentro das células ocorre em várias partes da planta. A presença de contaminantes solúveis específicos da planta, como polifenóis e ácidos orgânicos comprometem o processo de extração e purificação das proteínas farmacêuticas presentes na planta. Usar técnicas como centrifugação, filtração, floculação e métodos combinados de extração sólido-líquido com decantação ou purificação no processamento a jusante, acelera e facilita o processo de extração das proteínas farmacêuticas. Como alternativa, marcadores específicos das proteínas também podem simplificar as etapas do processamento a jusante, todavia a transposição para a escala industrial é ainda inatingível^{13,49}.

Em suma, os métodos de extração e purificação de proteínas recombinantes em plantas são baseados nos métodos utilizados para culturas de células animais e microbianas. Nos sistemas de expressão de plantas transgênicas é vital identificar os contaminantes solúveis e específicos de cada espécie plantar e standardizar os procedimentos a jusante, de forma a ajustar o método selecionado e a obter proteínas recombinantes de forma viável em larga escala, respetivamente¹³.

5. Vacinas Comestíveis

O conceito de vacinas comestíveis foi primeiramente introduzido em 1990 pelo Dr. Arntzen. Ele introduziu a ideia de usar plantas transgênicas para produzir e administrar vacinas de subunidade, em específico, as vacinas orais. Esta evidencia científica provou que as vacinas comestíveis podiam eliminar as restrições associadas às vacinas tradicionais. Nesse mesmo ano, a primeira vacina comestível contendo a proteína de superfície de *Streptococcus mutants*

foi obtida a partir da planta do tabaco, na qual a proteína recombinante representava 0,02% do total de proteínas solúveis da folha^{3,23,25,26}.

Em ordem para produzir uma vacina comestível, uma planta é geneticamente modificada para vir a poder expressar antigénios nas suas partes vegetais comestíveis²⁵. Estes antigénios são purificados, não são infecciosos, sendo, portanto, considerados seguros, e são selecionados especificamente pela sua capacidade indutora de uma resposta imune contra doenças humanas e animais^{23,52}. Estes agentes imunogénicos são expressos sob a forma de proteínas recombinantes e, muitas vezes, requerem a adição de adjuvantes mucosos potentes ou administrar doses múltiplas para provocar uma resposta imune robusta⁵³.

Após ingestão das partes vegetais comestíveis, como frutas e vegetais liofilizados, a vacina vai induzir tanto uma resposta imune sistémica, quanto uma resposta imune mucosal no trato gastrointestinal. A probabilidade de surgir contaminação por patógenos de plantas é muito reduzida ou improvável, pois os antigénios da planta não têm tendência de infetar humanos⁵².

Atualmente, não há nenhuma vacina comestível aprovada para uso humano. Contudo, vacinas comestíveis à base de plantas contra diferentes doenças estão a ser desenvolvidas e algumas já se encontram em ensaios clínicos de fase I e 2²⁵.

5.1. Mucosa Gastrointestinal

A mucosa gastrointestinal é a região mais ativa do sistema imunológico nos mamíferos. Esta mucosa é composta por componentes imunes especializados do sistema imunitário. Esses componentes incluem não só células do sistema imunológico inato que captam o antigénio e secretam sinais pró-inflamatórios, como também células do sistema imunológico adaptativo que estão encarregues por identificar o vírus, pelas funções específicas efetoras e pela memória imunológica. A indução da imunidade da mucosa é determinante para espoletar mecanismos de proteção contra patógenos que geralmente invadem as mucosas. Esta indução imunológica é maximizada à custa da administração de vacinas orais, em particular, vacinas comestíveis, que atuam na mucosa⁵⁴.

Não obstante, a via oral apresenta alguns inconvenientes que impedem a estimulação imune na mucosa gastrointestinal. O mais patente é o contacto do antigénio com o pH ácido do estômago e a duração da imunização oral. Nas vacinas de subunidades, como a vacina comestível, existe uma grande probabilidade de ocorrer degradação do imunogénio no trato gastrointestinal por digestão proteolítica antes de ocorrer a estimulação imunológica, comprometendo assim a integridade do antigénio⁵⁵. A maior parte das moléculas antigénicas

pode ser degradada antes de chegar aos locais efetores na superfície do trato gastrointestinal. Para contornar esta limitação, estratégias como administrar grandes doses de vacinas comestíveis para compensar esta deficiência ou então, proteger o antígeno por encapsulamento das proteínas purificadas podem ser tidas em conta⁵⁶. Porém, a necessidade de grandes dosagens de vacina pode não compensar os custos vantajosos associados à administração oral²⁵ e o encapsulamento das proteínas em nanopartículas, micropartículas, virossomas e lipossomas, pode aumentar substancialmente os custos de produção destas vacinas⁵⁴. As vacinas candidatas necessitam de ter um revestimento resistente à digestão rápida e, ainda, devem permitir a libertação de antígeno suficiente para estimular respostas imunes^{41,54}. A administração oral de antígenos em estirpes bacterianas atenuadas é uma solução possível que oferece proteção antigénica, mas levanta questões de segurança sobre os veículos de entrega⁵⁶. Todavia, uma abordagem bastante promissora seria a agregação de antígeno em estruturas ordenadas como as partículas pseudovirais (VLPs, do *virus-like particles*)⁴¹.

5.2. Mecanismo de Ação

Tal como as vacinas convencionais, o objetivo das vacinas comestíveis é estabelecer uma resposta imunológica, oferecendo proteção contra a doença. As vacinas orais desempenham um papel fundamental no estímulo da imunidade da mucosa, induzindo a ativação das células inatas e adaptativas do sistema imunológico presentes neste tecido especializado²⁵. Os linfócitos estão dispostos em estruturas que revestem todo o tecido da mucosa, denominado tecido linfoide associado à mucosa (MALT). O tecido MALT pode ter diversas denominações conforme o local do organismo onde se encontra, entre eles tecido linfoide associado ao trato gastrointestinal (GALT) e tecido linfoide associado aos brônquios^{52,57}.

Existe um órgão do MALT, designado Placas de Peyer, que são aglomerados de folículos linfoides presentes no íleo do intestino delgado em humanos que contêm células imunológicas como linfócitos B e T e células dendríticas. Estes aglomerados estão circundados por uma camada epitelial de células chamada epitélio associado aos folículos que diverge da camada epitelial existente nas restantes vilosidades intestinais. Nesta camada epitelial estão presentes umas células especializadas, as células *Microfold* (M), que interagem com linfócitos circunjacentes e células apresentadoras de antígenos (APCs), em particular as células dendríticas (CD), visto serem as células antigénicas mais potentes para desencadear uma reação imune adaptativa nas células T^{3,23-25,52,55}.

As vacinas comestíveis são ingeridas por via oral, sob a forma de alimentos ou bebidas⁵². Após ingestão, os antígenos presentes na vacina entram em contacto com o trato

gastrointestinal. A indução da resposta imune na mucosa inicia-se com a detecção de um antígeno da vacina pelas células M²⁵. Estas células têm a principal função de capturar e transportar os antígenos, ou seja, vírus e bactérias. Acredita-se que as células M não executam a apresentação de antígenos aos linfócitos T, uma vez que apenas funcionam como uma porta de entrada do antígeno para o interior da zona folicular das Placas de Peyer⁵⁸. No que concerne às CD, estas captam os antígenos que são transportados do lúmen intestinal para o interior das Placas de Peyer pelas células M. Após internalização e processamento dos antígenos em fragmentos menores, as CD migram para as zonas de presença de células T nos folículos das Placas de Peyer ou nos nódulos linfáticos mesentéricos para apresentação do antígeno aos linfócitos^{25,52,55,58,59}.

A maioria dos estudos revelaram as Placas de Peyer e os nódulos linfáticos mesentéricos como as zonas de ativação de linfócitos T e apresentação de antígenos, em resposta à administração oral de antígenos em camundongos. Contudo, também têm sido descobertos antígenos nos glândulos linfáticos esplênicos e periféricos que levam à ativação das células T auxiliares (TCD4⁺), o que demonstra que as respostas imunes sistêmicas em órgãos linfoides periféricos não mucosos podem ser atingidas pela administração oral de antígenos⁵⁸.

No sistema imunitário, as células T são ativas pelo antígeno e diferenciam-se em células T citotóxicas (TCD8⁺) e células T auxiliares (TCD4⁺). Com o suporte das células T auxiliares e com a ligação de antígenos aos recetores na superfície das células T, ocorre a ativação das células B que migram para os nódulos linfáticos mesentéricos, diferenciando-se em células produtoras de anticorpos, conhecidas por plasmócitos. Os plasmócitos migram para as membranas mucosas e secretam imunoglobulinas A (IgAs) para o lúmen intestinal. Quando as IgAs passam da camada epitelial da mucosa para o lúmen intestinal, elas associam-se a componentes secretores ligados à membrana, originando IgAs secretoras que são transportadas para o lúmen intestinal e ligam-se aos epítomos, neutralizando o antígeno e ajudando o sistema imunológico a eliminá-lo^{24,25,52,59}.

Simultaneamente, alguns linfócitos T e linfócitos B, nomeadamente células T auxiliares e plasmócitos respetivamente, diferenciam-se também em células de memória de longa duração que persistem no organismo após combate ao antígeno. São responsáveis por fornecer memória imunológica, ou seja, se o organismo entrar em contacto com um antígeno ao qual já tinha sido exposto anteriormente, estas células têm a capacidade de o reconhecer, permitindo que o sistema imunitário produza uma resposta mais rápida e eficaz no combate ao patógeno, resultando numa imunidade humoral futura eficiente²⁵.

Na Figura 2 é apresentado o mecanismo de ação da vacina comestível²⁵.

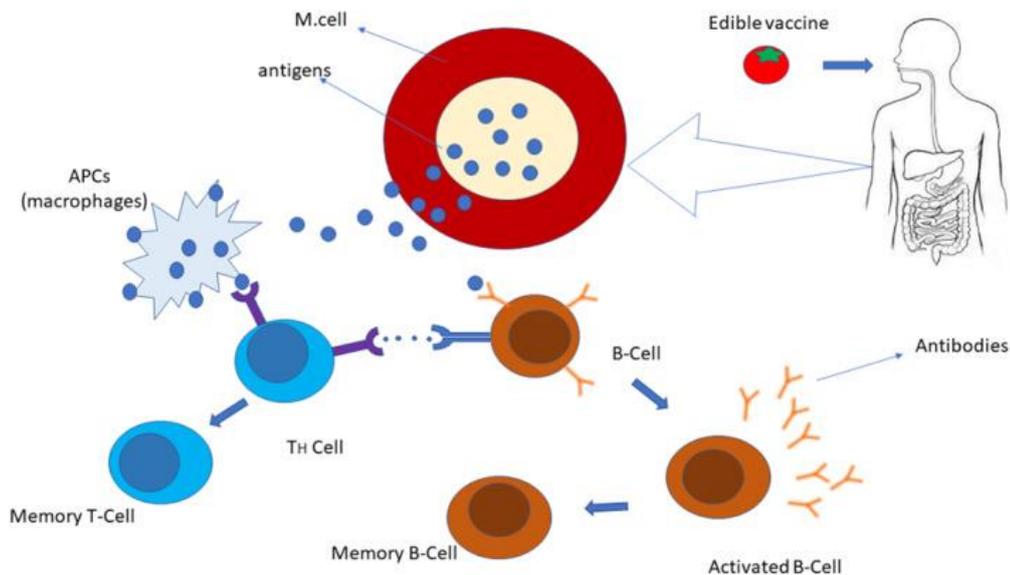


Figura 2. Mecanismo de ação da vacina comestível: vacina estimula o sistema imunitário. APCs apresentam o antígeno às células B para ativá-las e libertar anticorpos que vão combater contra o vírus. (Retirado de ²⁵)

Desta forma, as vacinas comestíveis são as formulações mais conhecidas capazes de induzir tanto imunidade mucosa como sistêmica, apesar de apresentar riscos associados como tolerância oral e reações alérgicas^{3,47,52}.

5.3. Vacinas Comestíveis candidatas

5.3.1. Vírus da Hepatite B

Aproximadamente 2 mil milhões de pessoas a nível mundial são ou foram alvo de suspeita de infeção pelo vírus da Hepatite B, segundo as estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS). Cerca de 3,5% de pessoas estão infetadas cronicamente com o vírus da Hepatite B (VHB) ou vírus da Hepatite C e ocorrem anualmente mais de 800000 mortes devido a complicações hepáticas como cirrose e carcinoma hepatocelular, o que evidencia um elevado nível de ameaça e preocupação para a saúde pública⁴⁶.

Uma opção à imunização parentérica é a aposta no desenvolvimento de vacinas administradas oralmente, pois, como discutido anteriormente, a expressão de antígenos em plantas transgênicas ostenta a capacidade de estimular a imunidade da mucosa e a imunidade humoral, revertendo para uma proteção mais eficiente comparativamente à imunidade parenteral. Por isso, uma alternativa plausível para a imunização oral do VHB é a expressão de antígenos em plantas geneticamente modificadas^{58,60}.

Nos últimos 30 anos, várias equipas científicas em todo mundo investigaram a expressão de antígeno de superfície do Vírus da Hepatite B (HBsAg) em inúmeros tecidos de plantas para a produção de vacinas. Em 1992, foi publicado o primeiro relatório experimental que

revelou que as folhas de *Nicotiana tabacum* L. (planta do tabaco)^{46,58}, da Família *Solanaceae*⁶¹ são capazes de expressar um antigénio da vacina viral. Isto potenciou o avanço autêntico e significativo na biotecnologia de *Molecular Pharming*^{46,58}. Com base nestas conclusões, foi realizado um estudo em 1995 com extrato purificado de folhas de *N. tabacum* e frações concentradas de HBsAg para imunizar os camundongos^{46,58}. Verificou-se que a resposta sérica de anticorpos anti-HBsAg provocada pelo antigénio recombinante de superfície do Vírus da Hepatite B (rHBsAg) no extrato de folha de tabaco foi qualitativamente semelhante à resposta sérica de anticorpos anti-HBsAg obtida com rHBsAg proveniente de leveduras quando administrado por via intramuscular em camundongos. Deste modo, concluiu-se que a proteína rHBsAg derivada da planta *N. tabacum* apresentam propriedades imunológicas suficientes para provocar as respostas específicas das células B e T contra este antigénio⁵⁸.

Posteriormente, foram realizados outros estudos com a finalidade de avaliar a imunogenicidade oral do HBsAg em tubérculos da batata, tomates, milho e alface. As imunizações foram realizadas com a presença de adjuvantes, contudo não há atualmente adjuvantes de mucosa aprovados para uso humano, tornando-se num aspeto crítico em relação ao uso de vacinas comestíveis em humanos⁴⁶. No estudo com tubérculos de batata, *Solanum tuberosum* L.²⁵ da Família *Solanaceae*⁶², foi comparado o nível protetor anti-HBsAg com a vacina licenciada da hepatite B em camundongos. Ao grupo experimental foram ministradas 42 microgramas de HBsAg por dose de tubérculo de batata vinculados a um adjuvante de mucosa, a toxina da cólera. Este ensaio pré-clínico permitiu deduzir a necessidade de utilizar um adjuvante para garantir imunogenicidade oral a HBsAg em camundongos e demonstrou que houve perda de imunogenicidade após o cozimento da batata. Coletando todos os dados do ensaio, concluiu-se que as vacinas de plantas transgênicas têm a capacidade de atuar como reforço oral em camundongos já imunizados com a dose parentérica de proteína rHBsAg^{46,58}.

Em seguida, foi realizado um estudo duplo-cego randomizado em 42 humanos antecipadamente vacinados com a vacina da hepatite B licenciada. Com o fim de avaliar a imunogenicidade para o HBsAg expressos na batata, verificou-se um aumento de anti-HBsAg no soro de 62,5% dos voluntários que ingeriram três doses de batata transgênica crua, 52,9% nos voluntários que comeram duas doses de batata e 0,0% nos voluntários que comeram batatas não transgênicas. Estes resultados permitem correlacionar a proteção a partir da administração oral do tubérculo de batata contra o vírus da hepatite B, mas é necessário realizar mais estudos para avaliar a correlação com o adjuvante da mucosa, com o objetivo de aumentar a eficácia imunizante^{46,58}.

Curiosamente, foi feito um estudo em tomateiros, *Solanum lycopersicum* L.²⁵ da Família *Solanaceae*⁶³, e verificou-se que o HBsAg expresso no tomate não provocou nenhuma resposta

imune em camundongos através da administração oral, mas poderia funcionar como vacina de reforço. Todavia, o estudo foi restrito pelos baixos níveis de expressão de HBsAg e pelas quantidades totais de tecido vegetal que poderiam ser ingeridas em 24 horas. Outro estudo foi realizado para avaliar a expressão de HBsAg no soro e fezes de ratos. Este ensaio provou que houve um aumento de anticorpos anti-HBsAg de forma significativa (inferior a 200 mUI/mL), que foram mantidos 3 meses após a imunização. Por conseguinte, o tomate é uma excelente biomassa, porque é facilmente transformado e é produzido de forma rápida nas plantas^{46,64}.

O milho, *Zea mays* L.²⁵ da Família *Poaceae*⁶⁵, também é um biorreator bastante atraente para a produção de vacinas orais, pois é mais apetitoso a nível do paladar do que a batata e fornece uma elevada expressão de HBsAg numa reduzida quantidade de material vegetal. Assim sendo, em 2012 foi realizado um estudo com sementes de milho em camundongos preliminarmente vacinados com uma vacina comercializada para a hepatite B por administração intramuscular. Constatou-se um aumento significativo nos níveis de anticorpos do soro (superior a 3000 mUI/mL) mesmo na ausência de adjuvantes após ingestão das sementes de milho transgênico. Níveis elevados de IgA também foram encontrados em fezes, insinuando a ativação de resposta imunitária da mucosa gastrointestinal, o que pode ser benéfico quando não há resposta pela via parentérica. Posto isto, os investigadores desenvolveram novas estratégias para prolongar a vida útil deste biorreator, como extração de lípidos, sem alterar as propriedades do antigénio^{46,66}.

Durante os últimos anos, a *Lactuca sativa* L.⁴⁶, da Família *Asteraceae*⁶⁷ vulgarmente conhecida por alface tem mostrado particular interesse para a produção de vacinas comestíveis, devido ao facto de poder ser consumida crua, eliminando assim os problemas de palatabilidade e degradação do antigénio após o cozimento presentes na batata. Tem sido explorada a plataforma de expressão transitória de alface para a produção de vacinas comestíveis contra a hepatite B, usando como modelo os camundongos. Os primeiros estudos realizados com a *L. sativa* avaliaram a imunogenicidade de vacinas comestíveis em humanos, no qual três voluntários humanos foram alimentados com duas doses de alface contendo HBsAg. Os voluntários não tinham sido anteriormente vacinados nem tinham infeção por hepatite B. No estudo realizado por KAPUSTA e colaboradores⁴⁶, dois dos três voluntários produziram elevados níveis de anticorpos anti-HBsAg (superiores a 10 mUI/mL) que foram detetados duas semanas após a imunização, o que é considerado protetor. No entanto, os níveis de anti-HBsAg desceram significativamente quatro semanas após a imunização.

A eficácia de vacinas à base de plantas administradas por via oral contra o vírus da hepatite B também foram investigadas, com base na capacidade do antigénio se agrupar em

partículas altamente imunogênicas semelhantes a capsídeo, conhecidas por VLPs, que demonstraram ativar o sistema imune após administração parenteral ou administração mucosal de HBsAg purificado^{46,68}.

Mais recentemente, foi realizada uma imunização em camundongos para avaliar a eficácia do HBsAg produzido nas folhas da alface transgênica como vacina parenteral-oral. O HBsAg presente no extrato de *N. benthamiana*, foi injetado por via intramuscular como dose primária, seguida de dose de reforço com administração oral de folha de *L. sativa*. Os resultados exibiram altos níveis de anticorpos séricos para o núcleo da hepatite B (anticorpos totais) (superior a 25000 mUI/mL), bem como uma resposta imune majoritariamente linfócitos T auxiliares tipo I, que é vantajoso no tratamento de infecções crônicas, como a hepatite B^{46,69}.

Resumidamente, os resultados destes estudos sugerem que as vacinas orais à base de plantas que expressam antígenos da hepatite B podem funcionar como uma opção eficaz e de baixo custo à vacinação de reforço, mas os protocolos de imunização devem ser aperfeiçoados no que diz respeito à dosagem e adjuvante mucoso⁴⁶.

5.3.2. Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)

O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o HIV-I tem sido um desafio bastante complexo e contínuo, devido à grande capacidade mutável do vírus e à capacidade de evadir das respostas do sistema imunitário⁷⁰. Várias abordagens de vacinas contra o HIV-I foram testadas em animais e humanos, no entanto a maioria dessas vacinas candidatas são administradas por via injetável. O HIV infeta e causa a morte de linfócitos TCD4⁺ no GALT no trato gastrointestinal^{26,70}. Portanto, uma potencial estratégia de vacinação seria o uso de plantas transgênicas comestíveis para a produção de vacinas de administração oral, como é o caso das vacinas comestíveis, pois estas são capazes de expor o antígeno HIV-I da vacina ao GALT e, conseqüentemente, induzir a ativação de numerosas células imunocompetentes presentes no GALT⁷⁰.

Várias espécies de plantas, em concreto a *N. tabacum*²⁶, a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.^{26,70} (Família *Brassicaceae*)⁷¹ e a *Daucus carota* L.⁷⁰ (Família *Apiaceae*), conhecida como cenoura-brava⁷², foram descritas em vários estudos como as plantas de sucesso na produção do antígeno p24 do HIV-I individualmente ou como um complexo de fusão para posterior administração oral. A proteína p24 é responsável pela replicação viral, formando novas partículas virais nas células infetadas^{26,70}.

Um estudo foi realizado por LINDH e colaboradores, em camundongos de 6 a 12 semanas de idade, para analisar a imunogenicidade de cenouras transgênicas comestíveis (*D.*

carota) e plantas de *A. thaliana* expressando níveis altos ou baixos do antígeno HIV-1 p24 subtipo C após administração oral, com auxílio da toxina da cólera⁷⁰. Os resultados comprovaram que ambos os sistemas de plantas transgênicas⁷⁰ obtidos por transformação nuclear⁶⁰ mostraram um efeito de estimulação imunológica em camundongos, induzindo respostas imunes humorais, que foram detetadas no soro como expressão imunoglobulina G (IgG) específica anti-p24 após um reforço intramuscular de proteína p24. Análises de antígeno dependente de dose utilizando *A. thaliana* transgênica indicaram que doses baixas de antígeno p24 provocaram mais estimulação imunológica comparativamente a elevadas doses de antígeno p24. Os investigadores concluíram que possivelmente foi desenvolvida tolerância oral induzida pelas células T reguladoras CD8⁺ nas doses elevadas de antígeno, o que pode ser algo a ter em conta na produção de vacinas contra o HIV⁷⁰.

Acredita-se também que, a proteína *Negative regulatory factor* (Nef) do HIV-1 seja uma potencial e promissora candidata a vacina, pois tem um papel fundamental no aumento da replicação viral, na transmissão e na progressão do vírus nas células. Desta maneira, as respostas imunes contra esta proteína viral ajudam a controlar o começo da infecção viral e reduzem a carga viral e a propagação do vírus²⁶.

Neste sentido, foi realizado um ensaio pré-clínico por GONZALEZ-RABADE e colaboradores⁷³, para averiguar a imunogenicidade da proteína de HIV-1 p24 derivado do cloroplasto da planta *N. tabacum* e de uma fusão de proteína p24 com a proteína reguladora negativa Nef (p24-Nef) após administração subcutânea e oral em camundongos, usando a subunidade B da toxina da cólera como adjuvante. Inicialmente, foi comparada a imunogenicidade em camundongos entre a proteína p24 derivada do cloroplasto da planta do tabaco e a proteína p24 derivada da *Escherichia coli*, uma bactéria da Família *Enterobacteriaceae*⁷⁴. Quatro grupos de camundongos foram imunizados, dois deles foram injetados por via subcutânea com 10 ou 1 µg de proteína p24 derivada do cloroplasto e os outros dois grupos receberam 10 µg de proteína p24 derivada de *E. coli* como controlo negativo. A imunização subcutânea com a proteína p24 derivada do cloroplasto purificado provocou uma forte resposta de imunoglobulina G sérica específica do antígeno, comparativamente àquela produzida por proteína p24 derivada de *E. coli*.

Em seguimento, também foi feita imunização oral de uma preparação de extrato vegetal parcialmente purificado de proteína de fusão p24-Nef derivado do cloroplasto⁷³. A acumulação de proteína de fusão p24-Nef no cloroplasto de folhas de plantas transplastômicas de *N. tabacum* é muito maior (40% da proteína solúvel total) do que a acumulação de proteína p24 (4% da proteína solúvel total) no cloroplasto da folha da planta⁷³.

Adicionalmente, cinco grupos de camundongos foram imunizados para avaliar a imunogenicidade oral da proteína de fusão p24-Nef derivado do cloroplasto e comparar a resposta com a obtida pela administração oral de p24 ou Nef derivada de *E. coli*. Três grupos receberam 50 µg de antígeno (p24-Nef, p24 ou Nef) administrados por via oral. Um grupo de controlo negativo recebeu quantidade equivalente de proteína de fusão p24-Nef, mas não continha nenhuma proteína p24 ou Nef e um outro grupo recebeu previamente uma injeção subcutânea de 10 µg de proteína p24 e 10 µg de Nef de *E. coli* antes de ser imunizado oralmente com proteína de fusão p24-Nef derivado do cloroplasto. Dentro dos resultados obtidos, apenas a proteína p24 derivada de *E. coli* teve boa resposta de IgG específica para p24 entre os grupos que receberam apenas antígenos administrados por via oral, atingindo resposta máxima após três reforços. A administração de três doses de p24-Nef não provocou resposta sérica ao p24 ou ao Nef, sendo a causa da falta de resposta desconhecida. O Nef de *E. coli* não gerou resposta de IgG específica para p24 quando administrados por via oral. No grupo de imunização prévia, os anticorpos anti-p24 e anti-Nef foram detetados 13 dias após a administração subcutânea e aumentaram bastante com o reforço de p24-Nef. Houve um aumento em aproximadamente três vezes da resposta de IgG específica para p24 (parecendo ser máxima devido a poucas alterações visíveis no segundo e terceiro reforço) após o primeiro reforço oral com proteína de fusão p24-Nef. A resposta IgG específica para Nef foi um pouco mais lenta, necessitando de dois reforços de proteína de fusão p24-Nef antes de atingir a resposta máxima. Quando administrado por via oral individualmente, o Nef derivado de *E. coli* não provocou qualquer resposta de IgG significativa para Nef. Posteriormente, foi realizado um estudo com seis grupos de camundongos para avaliar a estratégia *prime-boost* com a proteína p24, Nef e p24-Nef. Verificou-se que o reforço oral (*boost*) com proteína de fusão p24-Nef derivado de cloroplasto após imunização inicial (*prime*) por via subcutânea com proteína p24 ou Nef, provocou a maior resposta sérica de IgG específica para p24 e Nef, comparativamente àquela produzida por reforço com proteína p24 ou proteína Nef derivado de *E. coli*⁷³.

Todos estes resultados indicam que a proteína de fusão p24-Nef do HIV derivado de cloroplasto é um candidato potencial e promissor como componente de uma vacina de subunidade ministrada por reforço oral, após iniciação subcutânea por injeção de proteína p24 e/ou proteína Nef⁷³.

6. Vacinas de partículas pseudovirais

Os vírus de plantas são fortemente valorizados como transportadores de antígenos, uma vez que podem ser produzidas altas doses nas plantas, são muito estáveis e facilmente purificados. Além disso, eles não infetam seres humanos, revogando assim quaisquer preocupações de segurança¹⁶.

As vacinas compostas por nanopartículas semelhantes a vírus (VNPs) são dos tipos de vacinas à base de plantas mais recentemente produzidas. Existem variadas VNPs, entre as quais, as VLPs, partículas de exibição de VLPs e os pseudovírus^{1,75}.

As vacinas VLPs derivadas de plantas têm as mesmas características das vacinas convencionais para ocasionar uma resposta imune celular e humoral rápida e vigorosa, mas não têm a capacidade de replicação viral e a capacidade de originar doenças^{51,76}. Isto deve-se à preservação do tamanho, forma e estruturas simétricas do vírus nativo nas VLPs, o que as tornam imunogênicos ideais para o sistema imunitário humano.^{77,78}. Neste sentido, as VLPs são estruturas que se assemelham ao vírus infeccioso na sua forma, mas diferem na sua composição interna. Elas são compostas por proteínas virais, em específico, proteínas do capsídeo que formam a estrutura externa do vírus, mas não contêm material genético viral (RNA) necessário para a replicação viral. Logo, as VLPs não têm caráter infeccioso, pois não possuem a capacidade de replicar o vírus e causar infecção ativa, e, portanto, são frequentemente consideradas seguras. Por isso, as características intrínsecas das VLPs são uma das razões para o grande sucesso e procura como plataforma de vacinas recombinantes⁵¹.

Encontra-se documentado que as VLPs são estruturas nanométricas proteicas uniformes com capacidade de organização espontânea. Estas são produzidas por meio expressão de genes virais em sistemas de expressão celular ou em plantas geneticamente modificadas. A expressão desses genes leva à síntese das proteínas virais, as proteínas do capsídeo viral, que se auto-organizam para formar uma estrutura semelhante à do vírus inato^{1,22}.

Por outro lado, as VNPs também incluem as VLPs quiméricas¹. Estas partículas quiméricas são produzidas por acoplação dos epítopos às proteínas do capsídeo na superfície das VLPs por conjugação química ou fusão genética. Detalhadamente ocorre a fusão das sequências genéticas de codificação de proteínas de revestimento, as proteínas do capsídeo viral, e uma proteína de interesse, o epítipo ou antígeno heterólogo. Posteriormente, estas proteínas quiméricas organizam-se espontaneamente para formar uma estrutura semelhante à do vírus infeccioso com a expressão de epítopos à superfície das proteínas capsídicas, as VLPs quiméricas^{1,51,79}.

Logo, as VLPs quiméricas funcionam como um sistema de apresentação dos epítomos heterólogos ao sistema imunitário, estimulando as células imunes devido à natureza das partículas e à produção de antígenos de alta densidade⁵¹.

Por fim, a produção de vacinas VLPs em plantas pode proporcionar propriedades adjuvantes significativas, contribuindo para o aumento da imunogenicidade da proteína recombinante e evitando o uso de adjuvantes adicionais, poupando assim recursos econômicos⁵¹. A via de administração mais amplamente usada nas vacinas VLPs é a via intramuscular, através de injeções, embora estudos estejam em andamento para a avaliação de novas vias de administração deste tipo de vacinas, nomeadamente a via intranasal e a via oral^{14,36}.

6.1. Mecanismo de ação

As vacinas VLPs induzem imunidade celular e humoral sem a necessidade de adjuvantes, pois desencadeiam uma poderosa resposta imune às células T, levando à produção de elevados níveis de anticorpos. As respostas imunes adaptativas são induzidas principalmente nos órgãos linfoides secundários, através do transporte do antígeno viral e células imunológicas periféricas pelo sistema linfático dos tecidos periféricos¹⁸.

Após administração da vacina, as VLPs são internalizadas pelas APCs por fagocitose seguido de processamento das VLPs em fragmentos peptídicos, chamado epítomos, As APCs cruciais para indução da resposta imune de células T são as CD e provavelmente macrófagos. O peptídeo viral é transportado pelas APCs e é apresentado aos linfócitos TCD4⁺ pelas APCs em associação com o Complexo Principal de Histocompatibilidades Classe II, induzindo a ativação dos mesmos. Ademais, as VLPs geralmente exibem diferentes padrões moleculares associados a agentes patogênicos (PAMPs) que são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (RRPs). Estes PAMPs induzem respostas imunes através da interação com RRP, entre eles os receptores do tipo Toll (TLRs, *Toll-like receptors*) em células imunológicas especializadas. As células TCD4⁺, ao serem ativadas pelo antígeno viral, secretam citocinas que ativam as células B. Os linfócitos B também são ativados pela ligação cruzada entre VLPs e receptores das células B (BCRs). As células B ativadas diferenciam-se em células B de memória e plasmócitos que secretam IgGs que neutralizam as VLPs que contêm o antígeno de interesse^{18,79}. A Figura 3 ilustra a ativação de respostas imunes por VLPs⁷⁹.

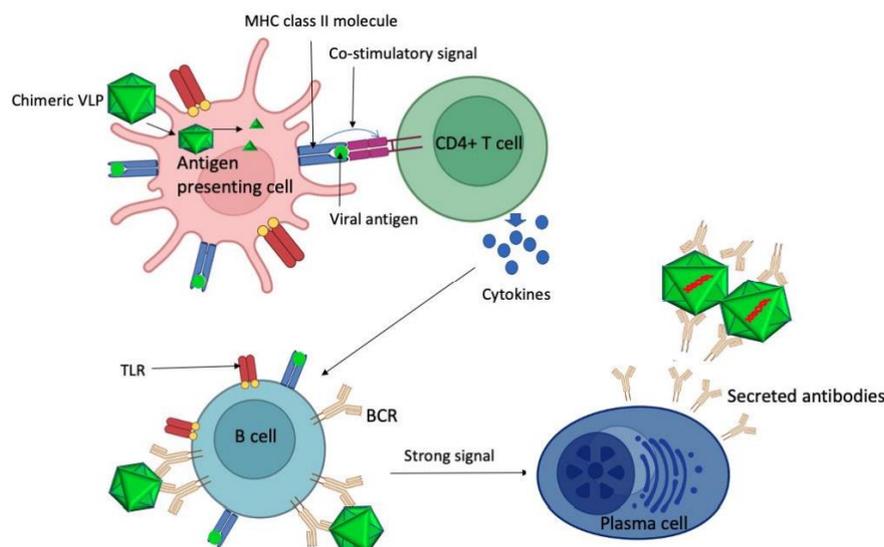


Figura 3. A ativação de respostas imunes por VLPs. Células apresentadoras de antígenos fagocitam e processam VLPs em fragmentos, que são apresentados às células T auxiliares com a ajuda do MHC classe II (imagem superior). Isso leva à ativação de células T auxiliares, que secretam citocinas que ativam as células B (abaixo). As células B também são ativadas pela ligação cruzada de receptores de células B (BCRs) por VLPs. As células B ativadas dividem-se e diferenciam-se em células plasmáticas e células de memória (não mostradas aqui). As células plasmáticas secretam anticorpos no corpo, que neutralizam o vírus de interesse do qual as VLPs foram derivadas. (Retirado de ⁷⁹)

6.2. Vacinas de partículas pseudovirais candidatas

6.2.1. Vírus *Influenza*

Os vírus *Influenza* pertencem à Família *Orthomyxoviridae* e são de quatro tipos: *Influenza* tipo A, *Influenza* tipo B, *Influenza* tipo C e *Influenza* tipo D. Os vírus *Influenza* tipo A e B são os únicos vírus clinicamente significativos para a saúde humana. Enquanto o vírus *Influenza* tipo B infeta apenas humanos, o vírus *Influenza* tipo A infeta humanos e uma variedade de aves e mamíferos. O vírus *Influenza* é um vírus zoonótico e capaz de originar pandemias⁸⁰.

Segundo a OMS, o vírus da gripe é um vírus que causa doenças respiratórias e mata anualmente cerca de 250000 a 50000 pessoas, tratando-se de um problema de saúde pública⁸¹. Mundialmente, existe uma escassez de vacinas contra o vírus *Influenza* e as técnicas de produção desta vacina precisam de ser melhoradas para atender à capacidade rápida de produção de vacinas^{80,82}. Deste modo, a Engenharia Molecular de plantas pode atender a estas necessidades, porque através dos seus sistemas de expressão de proteínas recombinantes, consegue desenvolver e fabricar vacinas em curto tempo e em larga escala⁸⁰.

O vírus *Influenza* é um vírus com envelope que contém um genoma de RNA de cadeia simples. O envelope viral é constituído por glicoproteínas transmembranares presentes na superfície do vírus, designadamente trímeros da glicoproteína hemaglutinina (HA) e tetrâmeros de neuraminidase (NA). A HA é a proteína mais abundante na superfície do vírus³⁶.

Durante a infecção viral, HA e NA são os antígenos primários que estimulam a produção de anticorpos⁸³. Atualmente, existem 18 variantes de HA e 11 variantes de NA^{80,84}, mas apenas 4 variantes de HA (H1, H2, H3 e H4) e duas variantes NA (N1 e N2) são vistas como ameaças pandêmicas graves⁸⁰.

Em 2009, a Agência de Projetos de Pesquisa Avançada de Defesa dos Estados Unidos investiu 100 milhões de dólares americanos em quatro empresas, detalhadamente a Fraunhofer USA, Center for Molecular Biotechnology in Delaware, Kentucky Bioprocessing e a Medicago Inc., para a produção de uma vacina à base de plantas contra o vírus da gripe⁸⁰. Em 2012, a Medicago produziu 10 milhões de doses de vacina contra *Influenza* H1N1 baseada em VLPs em apenas um mês, de acordo com os regulamentos das *Current Good Manufacturing Practice* (cGMP) de Fase I^{51,80}. Tal feito foi conseguido à custa de muitos anos de desenvolvimento científico e ao uso de vetores de expressão transitória, fornecendo a síntese e acumulação de grandes quantidades de proteínas recombinantes em plantas em apenas uma semana⁸⁰.

Nos dias de hoje, a Medicago Inc. lidera o mercado mundial na produção de vacinas VLPs à base de plantas contra o vírus *Influenza*⁵¹. Tudo isto começou com o desenvolvimento e produção pela primeira vez de vacinas monovalentes baseadas em VLPs para dar resposta contra variantes pandêmicas de H5N1 e H7N9, que posteriormente foram sucedidas pelo desenvolvimento de uma vacina VLP baseada em HA quadrivalentes contra a gripe sazonal que concluiu com sucesso os ensaios clínicos de fase I, fase 2 e, mais recentemente, fase 3 em 2020⁸⁵⁻⁸⁸. Foram realizados dois ensaios clínicos de fase 3 de uma vacina VLP quadrivalente recombinante obtida a partir da planta *N. benthamiana*: um estudo em adultos dos 18 aos 64 anos e outro estudo em adultos com mais de 65 anos. Os participantes do estudo de ambos os ensaios foram designados aleatoriamente para receber a vacina VLP quadrivalente recombinante ou placebo (vacina inativa quadrivalente), sendo que num ensaio 5077 adultos dos 18 aos 64 anos foram designados para receber a vacina e 5 083 adultos para receber o placebo e, no outro ensaio, 6396 adultos com idade igual ou superior a 65 anos foram designados para receber a vacina e 6398 adultos para receber o placebo. Os resultados mostraram que a vacina VLP quimérica quadrivalente à base de plantas contra o vírus *Influenza* oferece melhor proteção em adultos de todas as idades, em vez das vacinas da gripe comercializadas a partir de ovos de galinha. A vacina VLP foi bem tolerada e nenhum sinal de segurança importante surgiu nos participantes que receberam esta vacina nos dois estudos, devido à glicosilação derivada da planta. Desta forma, os investigadores concluíram que as vacinas VLPs candidatas derivadas de plantas podem fornecer proteção contra doenças respiratórias causadas por vírus *Influenza* em humanos. A notável eficácia demonstrada por

esta vacina contra o vírus *Influenza* produzida em plantas representa um marco importante no progresso da tecnologia *Molecular Pharming*^{36,85}. Neste seguimento, esta vacina VLP quimérica está atualmente à espera de aprovação pelas Agências Regulamentares de diferentes países, sob uma revisão ativa e minuciosa por parte das mesmas³⁶.

No presente, tem havido muito sucesso alcançado com a proteína HA presente na vacina VLP, mas outras proteínas do vírus *Influenza*, como a proteína de matriz M1, a NA e as nucleoproteínas ainda precisam ser investigadas como possíveis candidatas a vacinas, devido às suas características mais conservadas³⁶.

6.2.2. Vírus SARS-CoV-2

Em dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, na China, foi comunicado pela primeira vez o surgimento de infecções provocadas pelo SARS-CoV-2, um vírus com envelope e que contém RNA de cadeia simples no seu genoma. Este vírus pertence à Família *Coronaviridae* e causa infecções respiratórias em aves e mamíferos⁸⁹. Após ocorrer rápida disseminação viral a nível mundial, a OMS declarou pandemia em março de 2022. Mais tarde, em novembro de 2022 já estávamos perante mais de 628 milhões de casos de SARS-CoV-2 e aproximadamente 6,6 milhões de mortes. Esta situação emergente levou ao desencadeamento de produção de vacinas eficazes usando plataformas tradicionais e novas. No entanto, passado três anos, ainda continua a ocorrer a rápida disseminação do vírus entre a população, afetando a saúde pública global, pois ainda continua a ocorrer o aumento da morbidade e mortalidade consequentes deste vírus. Apesar de já terem sido desenvolvidas vacinas eficazes contra o Covid-19, novas vacinas são necessárias para combater as novas variantes do vírus e para suprimir as necessidades de toda a população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento^{51,90}.

Em vista disso, após o sucesso de produção de vacinas VLPs baseadas em plantas contra o vírus *Influenza*, a Medicago Inc. desenvolveu uma vacina candidata denominada CoVLP+AS03. Trata-se de uma partícula semelhante ao coronavírus (CoVLP) que expõe trímeros da proteína Spike modificada recombinante de SARS-CoV-2 incorporada no envelope viral lipídico. Esta CoVLP purificada foi produzida por expressão transitória na planta hospedeira *N. Benthamiana* e foi administrada por via intramuscular no deltóide com um adjuvante Adjuvant System 03 (AS03), uma emulsão óleo-água fabricada pela GlaxoSmithKline. AS03 inicia uma resposta imune inata transitória no local da injeção e drenagem nos glânglios linfáticos em modelos animais e no sangue periférico humano, o que intensifica e aperfeiçoa as respostas imunológicas de anticorpos e linfócitos T⁹⁰.

Cerca de 753 voluntários participaram no estudo de fase 2/3 randomizado e controlado por placebo, para avaliar a eficácia, segurança e imunogenicidade da vacina CoVLP+ AS03 começando pelo menos 7 dias após a segunda injeção e com análise realizada após detecção de pelo menos 160 casos. O ensaio foi dividido em 3 grupos de participantes: 306 adultos saudáveis entre os 18 anos e os 64 anos, 282 adultos mais velhos com idade igual ou superior a 65 anos e 165 adultos com comorbidades com idade igual ou superior a 18 anos que foram convidados a receber duas doses da vacina CoVLP+AS03 ou placebo por via intramuscular num intervalo de 21 dias. Dos 753 voluntários que receberam uma primeira injeção (placebo ou vacina), 730 (96,7%) também receberam uma segunda dose. Dados de segurança, tolerabilidade e imunogenicidade foram avaliados até 6 meses após a vacinação e os resultados iniciais de eficácia da vacina foram calculados após um acompanhamento médio de segurança de pelo menos 2 meses. Os resultados imunológicos apresentados incluem níveis de anticorpos neutralizantes nos dias 21 e 42, bem como reatividade cruzada de anticorpos neutralizantes a várias variantes, em detalhe a Alfa, Beta, Gama, Delta e Ómicron até 201 dias após a imunização. No estudo a nível da segurança, os resultados indicam que os efeitos adversos solicitados, que foram na maioria leves ou moderados e transitórios, foram mais frequentes no grupo da vacina do que no grupo do placebo e os efeitos adversos solicitados em Idosos mais velhos e Adultos com comorbidades foram geralmente menos frequentes do que em Adultos Saudáveis e a reatogenicidade foi maior após a segunda dose. A nível de tolerabilidade, a CoVLP+AS03 foi bem tolerada nos ensaios de Fase 2 e Fase 3. Além disso, efeitos adversos locais (dor no local da injeção) ocorreram em 92,3% dos participantes do grupo da vacina e 45,5% dos participantes do grupo do placebo, e efeitos adversos sistémicos (fadiga, mialgia e cefaleias) em 87,3% e 65,0%, respetivamente. A incidência de eventos adversos não solicitados foi praticamente semelhante nos dois grupos até 21 dias após cada dose (22,7% e 20,4%) e do dia 43 ao dia 201 (4,2% e 4,0%). Em relação à imunogenicidade, CoVLP+AS03 induziu seroconversão em mais de 35% dos participantes em cada grupo após a primeira dose e em aproximadamente 98% dos participantes, 21 dias após a segunda dose, concluindo assim que duas doses de CoVLP+AS03 induziram respostas de anticorpos fortes e comparáveis em todos os grupos, e uma única dose de CoVLP+AS03 foi suficiente para gerar uma resposta robusta em participantes soropositivos. Em todos os grupos de participantes, 21 dias após a segunda dose, os níveis de anticorpos neutralizantes no soro contra o SARS-CoV-2 foram aproximadamente 10 vezes maiores do que em um painel de soros convalescentes humanos^{90,91}.

Por fim, na Fase 3 foi avaliada a tolerabilidade e a reatividade cruzada do anticorpo neutralizante e sua durabilidade. A reatividade cruzada robusta e duradoura para as variantes

Alfa, Delta e Gama observadas correlacionam-se com a eficácia observada na parte de eficácia do ensaio de Fase 3. A eficácia geral da vacina foi de 71,0% contra qualquer sintomatologia da doença, 75,3% contra a variante Delta e 88,6% contra a variante Gama (e 100% para um número reduzido de infecções das variantes Alfa, Lambda e Mu). Nenhum dos casos de covid-19 submetidos para análise da eficácia da vacina no ensaio de Fase 3 deriva da variante Ómicron. Por sua vez, a reatividade cruzada com as variantes Alfa, Beta e Delta foi mantida até o dia 201 (>80%), enquanto a reatividade cruzada com a variante Gama foi reduzida, mas ainda substancial no dia 201 (73%). A reatividade cruzada à variante Ómicron caiu de 72% no dia 42 para 20% no dia 201. Com base nestes resultados de reatividade cruzada e com os resultados obtidos das outras variantes, é provável que a eficácia da vacina para a variante Ómicron seja inferior à obtida para a variante Delta e Gamma. Quase todos os participantes em todos os grupos (superior a 88%) apresentaram respostas celulares detetáveis (IFN- γ , IL-4 ou ambos) 21 dias após a segunda dose. Uma resposta com tendência para linfócitos T auxiliares tipo 1 foi mais evidente após a primeira dose e ainda estava presente após a segunda dose. Em adição, os resultados elucidaram que a vacina teve 78,8% de eficácia contra doenças moderadas a graves e 74% de eficácia nos participantes seronegativos no início do estudo^{90,91}.

Por fim, todos estes dados compilados demonstram que a vacina CoVLP+AS03 é bem tolerada e extremamente imunogénica, gerando respostas imunes duradouras, de pelo menos 6 meses, contra as diferentes variantes do vírus em adultos com idade igual ou superior a 18 anos com ou sem comorbilidades^{90,91}.

Esta vacina foi recentemente aprovada pela Health Canada para uso humano, no dia 24 de fevereiro de 2022, com o nome COVIFENZ[®], sendo considerada a primeira vacina contra o SARS-CoV-2 baseada em plantas^{1,36,92}.

7. Vantagens, Limitações e Riscos: Vacinas Comestíveis, Vacinas de Partículas pseudovirais e Vacinas Convencionais

Tanto as vacinas comestíveis como as vacinas VLPs à base de plantas apresentam vantagens significativas em relação às vacinas convencionais, no entanto não estão isentas de limitações, incluindo riscos com potencial impacto no ambiente e saúde humana^{3,26,93}.

Com a administração oral de vacinas comestíveis, não é necessário equipamento especializado como agulhas e seringas, nem pessoas qualificadas para a sua administração. Todos estes indicadores, reduzem favoravelmente o custo das vacinas orais, nomeadamente na administração das mesmas e anula a probabilidade de ocorrência de contaminações por eliminação ou reutilização incorreta de seringas. Tal não acontece com as vacinas injetáveis,

nomeadamente vacinas VLPs à base de plantas e vacinas tradicionais. Logo, o baixo custo e a facilidade de administração das vacinas comestíveis relativamente às vacinas injetáveis, pode vir a resultar num aumento apreciável no número de pessoas vacinadas. Estas vacinas orais tornam-se num potencial aliado, não só nos países em desenvolvimento, onde o acesso à saúde médica é escasso, mas também em países desenvolvidos, nos casos em que o doente necessita de muitas doses de reforço^{3,25,26,94}. Ademais, as plantas têm a capacidade de expressar mais do que um transgene, o que permite a administração de vacinas com vários antígenos em inoculações repetidas, sendo útil no caso de vacinas que necessitem de revacinação para produzir células de memória²⁶.

As vacinas VLPs e convencionais apresentam baixa resposta imune na mucosa, promovendo apenas respostas humorais sistémicas^{3,18,25}. Contrariamente, as vacinas comestíveis ativam tanto a imunidade sistémica como a imunidade da mucosa, apresentando assim um maior alcance na prevenção de doenças infecciosas^{3,26}. Porém, as vacinas VLPs são mais versáteis, porque podem ser utilizadas como plataformas de vacinas para diferentes vírus, tornando-as numa escolha promissora para combater várias doenças⁷⁹. Condições especiais de armazenamento, distribuição em cadeias de frio e produção em ambiente estéril são mandatárias para as vacinas injetáveis, que chegam a custar entre 200 a 300 milhões por ano para a sua preservação^{25,26}. Contudo, as vacinas comestíveis são armazenadas e transportadas à temperatura ambiente, sem necessidade de refrigeração, produzidas a granel com o cumprimento de requisitos menos rígidos de luz solar, água e minerais, produção, purificação e esterilização, economizando assim nos custos de investigação de vacinas a longo prazo²⁵.

Outra vantagem das vacinas comestíveis é o facto de estas poderem ser consumidas sob a forma de frutas e legumes, sem a necessidade de ampliar as respostas imunes com o uso de adjuvantes, pois compostos vegetais como lectinas, ao serem adicionadas às vacinas comestíveis, atuam como adjuvantes, melhorando a administração e a eficácia das proteínas terapêuticas resultando numa resposta imunológica forte e mais rápida. Como dito anteriormente, as vacinas VLPs também não necessitam de adjuvantes contrariamente às vacinas convencionais^{80,95}.

A produção de vacinas comestíveis e vacinas VLPs à escala industrial em estufas ou campos é possível quando comparadas com os sistemas de produção de vacinas em mamíferos e microorganismos (bactérias). Vinculados a todos estes benefícios, as vacinas comestíveis e as vacinas VLPs são mais seguras que as vacinas tradicionais, porque nenhum patógeno humano é capaz de se replicar nas plantas, eliminando assim o risco de contaminação por vírus ou endotoxinas bacterianas^{1,19,36}. Nas culturas de células mamíferas e bacterianas, esse risco de contaminação encontra-se presente⁹⁶. Adicionalmente, as vacinas VLPs devido ao facto de

terem uma estrutura semelhante à do vírus, são altamente imunogénicas, sendo capazes de desencadear poderosas respostas imunes¹⁴ e, em teoria, são mais estáveis do que as vacinas comestíveis, pois as vacinas comestíveis podem enfrentar alguns desafios de estabilidade do antígeno durante a preparação e processamento em alimentos comestíveis. Logo, as vacinas VLPs apresentam maior segurança quando comparadas com as vacinas atenuadas ou inativas e melhor estabilidade e imunogenicidade em comparação com as vacinas de subunidade⁵¹.

Além do mencionado, a produção de vacinas VLPs e comestíveis por expressão transitória permite a produção rápida e eficaz de antígenos em aproximadamente 8 semanas após a obtenção da sequência genética sem a necessidade de transformação genética estável⁹⁷. Isto resulta num processo menos demorado e complexo e com menos requisitos regulamentares a seguir para posterior comercialização, sendo útil em casos de situações pandémicas⁹⁸.

Apesar de todas as vantagens supramencionadas, as variações nas dosagens de antígeno de acordo com o tamanho dos alimentos comestíveis ou partes das plantas, o lento processo de escolha da planta, os níveis de expressão do transgene e os riscos associados a contaminação atmosférica são algumas limitações inerentes à produção de vacinas à base de plantas. Pode haver limitações nas vacinas comestíveis produzidas em alimentos, pois pode ocorrer a degradação do antígeno durante a cozedura dos alimentos, podendo a estabilidade da vacina ficar comprometida, o que é imprevisível. Além do mais, não é comunicado a cada pessoa que compra o fruto maduro, em que estado ele deve ser consumido.²⁶ Além disso, o controlo da expressão do transgene em proteínas recombinantes depende do promotor, da estabilidade do RNA mensageiro e dos codões otimizadores da espécie da planta³⁷.

A grande limitação da expressão de proteínas recombinantes em plantas transgénicas é a obtenção de dosagens adequadas de antígeno para conferir imunidade¹. Uma quantidade diminuta de antígeno pode não estimular uma resposta imunitária suficiente para fornecer proteção contra doenças infecciosas. A administração frequente de antígenos ou a entrega de uma dosagem incorreta, pode levar à tolerância e à ineficácia da vacina, pois o sistema imunitário fica sensível à vacina não conseguindo combater a doença⁹³. O desenvolvimento de tolerância é mais provável de acontecer em vacinas comestíveis e pouco comum em vacinas VLPs⁴⁶. De forma a contornar este problema de baixa expressão antigénica, é fundamental controlar o rendimento da expressão de proteínas, de forma a assegurar uma imunização consistente e eficaz⁹⁹. O rendimento de expressão de antígenos recombinantes varia consoante o estado de desenvolvimento da planta e das suas folhas, da altura do dia e da época de colheita⁵⁰.

Um dos problemas mais frequentes das vacinas comestíveis é o facto de muitos antígenos orais não serem imunogénicos, ou seja, o sistema imune intestinal não os reconhece como corpos estranhos. Por isso, são usados adjuvantes, como a subunidade B recombinante não tóxica da toxina da cólera, que é imunogénico na mucosa⁶⁰.

Comparativamente às vacinas tradicionais, as vacinas comestíveis e as vacinas VLPs são a melhor opção na prevenção de doenças, desde que sejam manipuladas corretamente. Por vezes, vacinas orais à base de plantas causam alergias. Após ingestão, vacinas comestíveis podem induzir reações alérgicas ao serem submetidos a processos de modificações pós-tradução. Também o uso de adjuvantes orais pode provocar respostas de hipersensibilidade a outras proteínas contidas na alimentação^{3,93}. Administrações repetidas da vacina podem levar ao aumento de estimulação de células T reguladoras, em oposição ao antígeno da vacina, causando reações de hipersensibilidade em pessoas com alergia ao pólen ou alergia alimentar³. Logo, um dos riscos preocupantes para a saúde humana é a exposição do trabalhador³⁶. O contacto ou inalação de compostos da planta durante a produção pode levar ao desenvolvimento de intolerância ou reações alérgicas⁹³.

Outro aspeto importante é a contaminação ambiental. O cultivo de plantas transgénicas para a produção de vacinas comestíveis e vacinas VLPs requer estrita monitorização. Apesar de já existir regulamentação para o cultivo de plantas transgénicas, a segurança e a qualidade das mesmas ainda continua a ser uma tarefa complicada. Durante a polinização, pode ocorrer contaminação cruzada entre plantas geneticamente modificadas e plantas não geneticamente modificadas, tornando as plantas transgénicas mais competitivas com outras plantas no ambiente natural. Algumas vezes, o antígeno ou o transgene pode ser libertado nas fontes de água e causar a contaminação dos lençóis de água, devido ao contacto de insetos e pássaros com as plantas. Desta forma, o antígeno pode ser exposto acidentalmente na cadeia alimentar humana e também afetar a população selvagem^{3,93}.

Todos estes riscos enumerados são regulados nos Estados Unidos da América pela *Food and Drug Administration*, na Europa pela *European Medicines Agency* e no Canadá pela *Health Canada*. Características intrínsecas das vacinas comestíveis e vacinas VLPs são exigidas pelas Autoridades Regulamentares através de ensaios clínicos e pré-clínicos para o desenvolvimento e licenciamento das vacinas^{93,100}.

8. Desafios das vacinas à base de plantas: regulamentação, ambiente e ética

Apesar da estratégia promissora do uso de vacinas à base de plantas, estes imunizantes enfrentam uma complexidade regulatória, ética e ambiental significativa para garantir a

qualidade, eficácia e segurança das vacinas. Em janeiro de 2005, a OMS realizou uma reunião para discutir a avaliação regulatória das vacinas à base de plantas. Após o seu término, a OMS declarou que a legislação aplicável às vacinas tradicionais (desenvolvimento, avaliação e utilização) seria estendida para a produção de vacinas à base de plantas, com a adição de normas específicas para a produção vegetal. Deste modo, as vacinas à base de plantas devem ser clinicamente testadas sob pedido de novo medicamento em investigação nos Estados Unidos da América e devem cumprir todos os requisitos regulatórios e cGMP^{3,24}. Porém, os requisitos regulatórios rigorosos aplicados às vacinas tradicionais e exigidos à produção de vacinas em plantas transgênicas são de uma enorme dificuldade de aplicação para a produção vegetal e para o sistema de administração oral, devido ao controlo obrigatório de todos os riscos associados, como acontece com as vacinas comestíveis⁹³.

Atualmente, não existe um sistema regulamentar-padrão para o licenciamento da produção de vacinas produzidas em plantas geneticamente modificadas. Contudo, diferentes sistemas regulamentares estão em vigor em diferentes Autoridades Nacionais Competentes, nomeadamente nos Estados Unidos da América, Europa e Canadá¹⁰⁰. Para combater esta desarmonia, as Indústrias Biofarmacêuticas têm unido esforços para desenvolver sistemas que se adequem melhor às exigências regulamentares para plataformas de culturas em suspensão de células vegetais heterotróficas, organismos unicelulares autotróficos, designadamente algas e plantas clonais autotróficas, nominalmente musgo e lentilha de água e têm estabelecido comunicações com as Autoridades para corrigir a legislação existente ou estabelecer novas diretrizes regulamentares que incluam plantas transgênicas de reprodução sexuada e sistemas de expressão transitória baseados em infiltração bacteriana e/ou vírus de plantas, como é o caso das vacinas VLPs¹⁰¹⁻¹⁰³. Por isso, com o intuito de alcançar um maior equilíbrio regulatório de forma mais simplificada no futuro, as Indústrias Biofarmacêuticas têm redirecionado a sua atenção para um reduzido número de tecnologias de plataformas, particularmente a expressão transitória em *N. benthamiana* e a transformação estável das culturas de tabaco e cereais e suas linhas celulares. Todavia, as indústrias de biofármacos ainda enfrentam alguns desafios de segurança e qualidade no processamento a montante (cultivo, seleção e modificação genética das plantas para expressão dos antígenos pretendidos), e no processamento a jusante (extração e purificação das proteínas recombinantes e formulação das vacinas), apesar de cada etapa de produção de vacinas em plantas geneticamente modificadas ser minuciosamente monitorizada e regulamentada¹⁰⁴. Garantir a uniformidade e a expressão eficiente e estável do antígeno nas plantas geneticamente modificadas para assegurar uma dose adequada para formulação das vacinas, fornecer as condições adequadas de crescimento da planta (como

humidade, temperatura, fertilizantes, etc.) em ambiente de estufa e/ou em campo aberto sob estrita regulamentação, comprometimento do processo de extração e purificação devido à presença de contaminantes solúveis específicos das plantas, contaminação cruzada vegetal, contaminação ambiental, contaminação alimentar e alergenicidade das vacinas são os principais aspectos críticos que requerem pesquisas constantes, otimização de processos, avanços tecnológicos e execução de cGMP para a certificar a qualidade, segurança e eficácia das vacinas transgênicas^{13,24,100}. Ainda assim, o principal desafio que as vacinas recombinantes enfrentam é a aceitação pela sociedade, pois não só existem opiniões apreensivas acerca do impacto negativo das plantas geneticamente modificadas no meio ambiente e na população, abordado anteriormente, mas também existe população de algumas áreas geográficas que possuem a crença de que as plantas e produtos geneticamente modificados são entidades maléficas que destroem o mundo. Por este motivo, cabe às Autoridades Regulamentares desmistificar essa ideologia^{3,24}.

Em suma, o futuro próspero das vacinas derivadas de plantas depende do êxito em variados critérios por parte das Indústrias Biofarmacêuticas, no entanto as Autoridades Regulamentares têm um papel primordial na sua concretização¹⁰⁴.

9. Conclusão e Perspetivas Futuras

As vacinas derivadas de plantas transgênicas representam uma fronteira promissora na área da imunização, oferecendo novas possibilidades para enfrentar os desafios globais de saúde pública, sendo um deles as pandemias. Com os avanços no campo da biotecnologia de *Molecular Pharming* foi possível a produção de proteínas recombinantes em plantas para a formulação de vacinas comestíveis e vacinas VLPs. A busca por novas abordagens na imunização tem sido impulsionada pelo potencial destas vacinas para superar os desafios associados às vacinas tradicionais e melhorar a eficiência e acessibilidade da imunização em larga escala.

As vacinas comestíveis e as vacinas VLPs podem desempenhar um papel fulcral no fornecimento de uma resposta eficaz a ameaças emergentes e na melhoria do acesso à imunização. Para que estas abordagens possam ser plenamente usufruídas, é necessário um esforço colaborativo entre investigadores, Agências Regulamentares e a sociedade para garantir o desenvolvimento das vacinas de forma responsável e a sua implementação bem-sucedida. Somente através de um compromisso contínuo com a investigação e a ética é que podemos alcançar o objetivo comum de uma imunização mais abrangente, eficaz e acessível para todos, principalmente para a população dos países em desenvolvimento.

O futuro para as vacinas VLPs e vacinas comestíveis é bastante promissor. Atualmente, já foi aprovada a primeira vacina VLP à base de plantas para uso em humanos, denominada COVIFENZ[®]. Além disso, estudos estão em andamento para desenvolver vacinas VLPs à base de plantas contra outras doenças, como a Hepatite B e muitas outras.¹ À medida que a tecnologia avança e a compreensão da ciência por trás das VLPs melhora, é provável que vejamos mais vacinas VLPs sendo desenvolvidas e aprovadas para uso em diversas doenças infecciosas futuramente. Todavia, no que diz respeito às vacinas comestíveis à base de plantas existem desafios a serem superados antes de sua implementação generalizada. Algumas das principais questões incluem a estabilidade das vacinas durante o processamento de alimentos, a proteção da vacina contra a degradação pelo sistema digestivo e a eficácia da resposta imunológica gerada por essa abordagem^{25,46}.

10. Bibliografia

1. STANDER, Jennifer; MBEWANA, Sandiswa; MEYERS, Ann E. - Plant-Derived Human Vaccines: Recent Developments. **BioDrugs**. ISSN 1179190X. 36:5 (2022) 573–589. doi: 10.1007/s40259-022-00544-8.
2. TROMBETTA, Claudia Maria *et al.* - Challenges in the development of egg-independent vaccines for influenza. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 17448395. 18:7 (2019) 737–750. doi: 10.1080/14760584.2019.1639503.
3. KURUP, Vrinda M.; THOMAS, Jaya - Edible Vaccines: Promises and Challenges. **Molecular Biotechnology**. ISSN 15590305. 62:2 (2020) 79–90. doi: 10.1007/s12033-019-00222-1.
4. WARZECHA, Heribert - Biopharmaceuticals from Plants: A multitude of options for posttranslational modifications. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**. ISSN 20465556. 25:1 (2008) 315–330. doi: 10.5661/bger-25-315.
5. GOUGH, D. O. - Evidence for an oblique magnetic solar rotator. **Nature**. ISSN 00280836. 298:5872 (1982) 350–354. doi: 10.1038/298350a0.
6. BUCCI, Mirella - First recombinant DNA vaccine for HBV. **Nature Milestones**. November (2020) S15.
7. HUEBBERS, J. W.; BUYEL, J. F. - On the verge of the market – Plant factories for the automated and standardized production of biopharmaceuticals. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 46:2021 (2021) 107681. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107681.
8. LAERE, Erna *et al.* - Plant-based vaccines: Production and challenges. **Journal of Botany**. ISSN 20900139. 2016:2016). doi: 10.1155/2016/4928637.
9. SHANMUGARAJ, Balamurugan; MALLA, Ashwini; PHOOLCHAROEN, Waranyoo - Emergence of novel coronavirus 2019-nCoV: Need for rapid vaccine and biologics development. **Pathogens**. ISSN 20760817. 9:2 (2020) 1–10. doi: 10.3390/pathogens9020148.
10. TUSÉ, Daniel *et al.* - The Emergency Response Capacity of Plant-Based Biopharmaceutical Manufacturing-What It Is and What It Could Be. **Frontiers in Plant Science**. ISSN 1664462X. 11:October (2020). doi: 10.3389/fpls.2020.594019.
11. KULAGINA, Natalja *et al.* - Yeasts as Biopharmaceutical Production Platforms. **Frontiers in Fungal Biology**. ISSN 26736128. 2:September (2021) 1–8. doi: 10.3389/ffunb.2021.733492.
12. FISCHER, R.; SCHILLBERG, S. - **Molecular Farming**. Second Edition. [S.l.] : Elsevier,

2016 Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-394807-6.00159-3> ISBN 9780123948083.

13. BUYEL, J. F.; TWYMAN, R. M.; FISCHER, R. - Extraction and downstream processing of plant-derived recombinant proteins. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 33:6 (2015) 902–913. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.04.010.
14. ZAHMANOVA, Gergana *et al.* - The Plant Viruses and Molecular Farming: How Beneficial They Might Be for Human and Animal Health? **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 24:2 (2023). doi: 10.3390/ijms24021533.
15. LOMONOSSOFF, George P.; D'AOUST, Marc André - Plant-produced biopharmaceuticals: A case of technical developments driving clinical deployment. **Science**. ISSN 10959203. 353:6305 (2016) 1237–1240. doi: 10.1126/science.aaf6638.
16. CHUNG, Young Hun *et al.* - Integrating plant molecular farming and materials research for next-generation vaccines. **Nature Reviews Materials**. ISSN 20588437. 7:5 (2022) 372–388. doi: 10.1038/s41578-021-00399-5.
17. MARIN, Victor Augustus - Transgênicos - Plantas Produtoras de Fármacos (PPF) Trangenics - Plant-Based Drugs (PBD). **Ciência & Saúde Coletiva**. ISSN 1413-8123. 16:7 (2011) 3339–3347.
18. MORADI VAHDAT, Maryam *et al.* - Hepatitis B core-based virus-like particles: A platform for vaccine development in plants. **Biotechnology Reports**. ISSN 2215017X. 29:2021) e00605. doi: 10.1016/j.btre.2021.e00605.
19. SHANMUGARAJ, Balamurugan; BULAON, Christine Joy I.; PHOOLCHAROEN, Waranyoo - Plant molecular farming: A viable platform for recombinant biopharmaceutical production. **Plants**. ISSN 22237747. 9:7 (2020) 1–19. doi: 10.3390/plants9070842.
20. GOODIN, Michael M. *et al.* - *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. ISSN 08940282. 21:8 (2008) 1015–1026. doi: 10.1094/MPMI-21-8-1015.
21. EIDENBERGER, Lukas; KOGELMANN, Benjamin; STEINKELLNER, Herta - Plant-based biopharmaceutical engineering. **Nature Reviews Bioengineering**. ISSN 2731-6092. 1:6 (2023) 426–439. doi: 10.1038/s44222-023-00044-6.
22. MARSIAN, Johanna; LOMONOSSOFF, George P. - Molecular pharming-VLPs made in plants. **Current Opinion in Biotechnology**. ISSN 18790429. 37:2016) 201–206. doi: 10.1016/j.copbio.2015.12.007.

23. SHAKOOR, S. *et al.* - Role of oral vaccines as an edible tool to prevent infectious diseases. **Acta Virologica**. ISSN 0001723X. 63:3 (2019) 245–252. doi: 10.4149/av_2019_301.
24. SAHOO, Ankit *et al.* - A cross talk between the immunization and edible vaccine: Current challenges and future prospects. **Life Sciences**. ISSN 18790631. 261:August (2020) 118343. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118343.
25. KHALID, Fatima *et al.* - Emerging trends of edible vaccine therapy for combating human diseases especially COVID-19: Pros, cons, and future challenges. **Phytotherapy Research**. ISSN 10991573. 36:7 (2022) 2746–2766. doi: 10.1002/ptr.7475.
26. JAIN, Aakanchha; SAINI, Vinay; VEER KOHLI, Dharm - Edible Transgenic Plant Vaccines for Different Diseases. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. ISSN 13892010. 14:6 (2013) 594–614. doi: 10.2174/138920101131400225.
27. WANG, Weiwei *et al.* - Non-Viral Gene Delivery Methods. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. ISSN 13892010. 14:1 (2013) 46–60. doi: 10.2174/1389201011314010008.
28. RAVI, Indu; BAUNTHIYAL, Mamta; SAXENA, Jyoti - Advances in biotechnology. **Advances in Biotechnology**. 9788132215:2013) 1–259. doi: 10.1007/978-81-322-1554-7.
29. YUSIBOV, Vidadi; RABINDRAN, Shailaja - Recent progress in the development of plant-derived vaccines. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 14760584. 7:8 (2008) 1173–1183. doi: 10.1586/14760584.7.8.1173.
30. FLORES-FÉLIX, José David *et al.* - History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. **Systematic and Applied Microbiology**. ISSN 16180984. 43:1 (2020) 126046. doi: 10.1016/j.syapm.2019.126046.
31. JOUNG, Young Hee; CHOI, Pil-Son; KWON, Suk-Yoon - **Current Technologies in Plant Molecular Breeding**. ISBN 9789401799966.
32. KIM, Tae Geum; YANG, Moon Sik - Current trends in edible vaccine development using transgenic plants. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. ISSN 12268372. 15:1 (2010) 61–65. doi: 10.1007/s12257-009-3084-2.
33. JAN, Naeema *et al.* - An overview on edible vaccines and immunization. **Austin J Nutri Food Sci**. ISSN 2381-8980. 4:2 (2016) 1078.
34. LI, Shaofang *et al.* - T-LOC: A comprehensive tool to localize and characterize T-DNA integration sites. **Plant Physiology**. ISSN 15322548. 190:3 (2022) 1628–1639. doi: 10.1093/plphys/kiac225.

35. ORTEGA-BERLANGA, Benita; PNIEWSKI, Tomasz - Plant-Based Vaccines in Combat against Coronavirus Diseases. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 10:2 (2022). doi: 10.3390/vaccines10020138.
36. VENKATARAMAN, Srividhya *et al.* - Combating human viral diseases: Will plant-based vaccines be the answer? **Vaccines**. ISSN 2076393X. 9:7 (2021) 1–35. doi: 10.3390/vaccines9070761.
37. FISCHER, Rainer *et al.* - Plant-based production of biopharmaceuticals. **Current Opinion in Plant Biology**. ISSN 13695266. 7:2 (2004) 152–158. doi: 10.1016/j.pbi.2004.01.007.
38. CHEN, Qiang; LAI, Huafang - Gene delivery into plant cells for recombinant protein production. **BioMed Research International**. ISSN 23146141. 2015:2015). doi: 10.1155/2015/932161.
39. SHUKLA, Sourabh *et al.* - Plant Viruses and Bacteriophage-Based Reagents for Diagnosis and Therapy. **Annual Review of Virology**. ISSN 23270578. 7:1 (2020) 559–587. doi: 10.1146/annurev-virology-010720-052252.
40. ASWATHI, Plantharayil Bharathan - Plant Based Edible Vaccines against Poultry Diseases: a Review. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**. 2:5 (2014) 305–311. doi: 10.14737/journal.aavs/2014/2.5.305.311.
41. ABOUL-ATA, Aboul Ata E. *et al.* - **Plant-based vaccines: Novel and low-cost possible route for mediterranean innovative vaccination strategies** 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2014 Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00001-X>. ISBN 9780128001721.
42. SAINSBURY, Frank; LOMONOSSOFF, George P. - Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. **Plant Physiology**. ISSN 15322548. 148:3 (2008) 1212–1218. doi: 10.1104/pp.108.126284.
43. GUAN, Zheng Jun *et al.* - Recent advances and safety issues of transgenic plant-derived vaccines. **Applied Microbiology and Biotechnology**. ISSN 01757598. 97:7 (2013) 2817–2840. doi: 10.1007/s00253-012-4566-2.
44. ABREU, Paolla Mendes Do Vale De; VAZ, Aline Brito; FERNANDES, Patricia Machado Bueno - Enfoque biotecnológico para o controle de vírus de plantas. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. 2017) 709–734. doi: 10.5151/9788521211150-20.
45. YUE, Wei *et al.* - Medicinal plant cell suspension cultures: Pharmaceutical applications

- and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. **Critical Reviews in Biotechnology**. ISSN 15497801. 36:2 (2016) 215–232. doi: 10.3109/07388551.2014.923986.
46. PANTAZICA, Ana Maria Madalina *et al.* - Challenges and prospects of plant-derived oral vaccines against hepatitis b and c viruses. **Plants**. ISSN 22237747. 10:10 (2021) 1–17. doi: 10.3390/plants10102037.
47. MERLIN, Matilde; PEZZOTTI, Mario; AVESANI, Linda - Edible plants for oral delivery of biopharmaceuticals. **British Journal of Clinical Pharmacology**. ISSN 13652125. 83:1 (2017) 71–81. doi: 10.1111/bcp.12949.
48. RYBICKI, Edward P. - Plant molecular farming of virus-like nanoparticles as vaccines and reagents. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**. ISSN 19390041. 12:2 (2020) 1–22. doi: 10.1002/wnan.1587.
49. GAOBOTSE, Goabaone *et al.* - Recent Progress on Vaccines Produced in Transgenic Plants. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 10:11 (2022) 1–21. doi: 10.3390/vaccines10111861.
50. DANIELL, Henry *et al.* - Plant-made vaccine antigens and biopharmaceuticals. **Trends in Plant Science**. ISSN 13601385. 14:12 (2009) 669–679. doi: 10.1016/j.tplants.2009.09.009.
51. HEMMATI, Farshad *et al.* - Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. **Biotechnology Letters**. ISSN 15736776. 44:1 (2022) 45–57. doi: 10.1007/s10529-021-03211-0.
52. GUNASEKARAN, B.; GOTHANDAM, K. M. - A review on edible vaccines and their prospects. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. ISSN 1414431X. 53:2 (2020) 1–10. doi: 10.1590/1414-431x20198749.
53. LV, Zongyou *et al.* - Nanoparticle-mediated gene transformation strategies for plant genetic engineering. **Plant Journal**. ISSN 1365313X. 104:4 (2020) 880–891. doi: 10.1111/tpj.14973.
54. ROSALES-MENDOZA, Sergio; SALAZAR-GONZÁLEZ, Jorge A. - Immunological aspects of using plant cells as delivery vehicles for oral vaccines. **Expert Review of Vaccines**. ISSN 17448395. 13:6 (2014) 737–749. doi: 10.1586/14760584.2014.913483.
55. KWONG, Keith Wai-Yeung *et al.* - Oral Vaccines : A Better Future of Immunization. (2023).
56. STREATFIELD, Stephen J. - Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. **Methods**. ISSN 10462023. 38:2 (2006) 150–157. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.09.013.

57. KWON, Kwang Chul *et al.* - Oral delivery of human biopharmaceuticals, autoantigens and vaccine antigens bioencapsulated in plant cells. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169409X. 65:6 (2013) 782–799. doi: 10.1016/j.addr.2012.10.005.
58. THANAVALA, Yasmin; LUGADE, Amit A. - Oral transgenic plant-based vaccine for hepatitis B. **Immunologic Research**. ISSN 0257277X. 46:1–3 (2010) 4–11. doi: 10.1007/s12026-009-8127-4.
59. CONCHA, Christopher *et al.* - Disease prevention: An opportunity to expand edible plant-based vaccines? **Vaccines**. ISSN 2076393X. 5:2 (2017) 1–23. doi: 10.3390/vaccines5020014.
60. HEFFERON, Kathleen - Plant-derived pharmaceuticals for the developing world. **Biotechnology Journal**. ISSN 18606768. 8:10 (2013) 1193–1202. doi: 10.1002/biot.201300162.
61. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Nicotiana tabacum L.** atual. 2023. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Nicotiana_tabacum
62. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Solanum tuberosum L.** atual. 2023. Disponível em WWW:<URL:https://jb.utad.pt/especie/Solanum_tuberosum
63. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Solanum lycopersicum L.** atual. 2023. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Solanum_lycopersicum
64. SALYAEV, R. K. *et al.* - Candidate mucosal vaccine against hepatitis B based on tomatoes transgenic for the preS2-S gene. **Doklady Biochemistry and Biophysics**. ISSN 16076729. 446:1 (2012) 257–259. doi: 10.1134/S1607672912050109.
65. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Zea mays L.** atual. 2023. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Zea_mays_subesp_mays
66. HAYDEN, Celine A. *et al.* - Bioencapsulation of the hepatitis B surface antigen and its use as an effective oral immunogen. **Vaccine**. ISSN 0264410X. 30:19 (2012) 2937–2942. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.02.072.
67. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Lactuca sativa L.** atual. 2023. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Lactuca_sativa
68. BUCHMANN, Pascale *et al.* - A novel therapeutic hepatitis B vaccine induces cellular and humoral immune responses and breaks tolerance in hepatitis B virus (HBV) transgenic mice. **Vaccine**. ISSN 0264410X. 31:8 (2013) 1197–1203. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.12.074.

69. PYRSKI, Marcin *et al.* - Parenteral–oral immunization with plant-derived hbcag as a potential therapeutic vaccine against chronic hepatitis B. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 7:4 (2019) 1–11. doi: 10.3390/vaccines7040211.
70. LINDH, Ingrid *et al.* - Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses. **Vaccine**. ISSN 18732518. 32:20 (2014) 2288–2293. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.02.073.
71. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.** [Em linha], atual. 2023. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Arabidopsis_thaliana
72. UTAD JARDIM BOTÂNICO - **Daucus carota L.** [Em linha], atual. 2023. Disponível em https://jb.utad.pt/especie/Daucus_carota_subesp_carota
73. GONZALEZ-RABADE, Nuria *et al.* - Immunogenicity of chloroplast-derived hiv-1 p24 and a p24-nef fusion protein following subcutaneous and oral administration in mice. **Plant Biotechnology Journal**. ISSN 14677644. 9:6 (2011) 629–638. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00609.x.
74. JANG, J. *et al.* - Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal of Applied Microbiology**. ISSN 13652672. 123:3 (2017) 570–581. doi: 10.1111/jam.13468.
75. TARIQ, Hasnat *et al.* - Virus-Like Particles: Revolutionary Platforms for Developing Vaccines Against Emerging Infectious Diseases. **Frontiers in Microbiology**. ISSN 1664302X. 12:January (2022). doi: 10.3389/fmicb.2021.790121.
76. WANG, Chong *et al.* - Novel chimeric virus-like particles vaccine displaying MERS-CoV receptor-binding domain induce specific humoral and cellular immune response in mice. **Antiviral Research**. ISSN 18729096. 140:2017) 55–61. doi: 10.1016/j.antiviral.2016.12.019.
77. MOHSEN, Mona O. *et al.* - Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. **Vaccines**. ISSN 2076393X. 6:3 (2018) 1–12. doi: 10.3390/vaccines6030037.
78. ZELTINS, Andris - Protein complexes and virus-like particle technology. **Subcellular Biochemistry**. ISSN 03060225. 88:2018) 379–405. doi: 10.1007/978-981-10-8456-0_16.
79. KHEIRVARI, Milad; LIU, Hong; TUMBAN, Ebenezer - Virus-like Particle Vaccines and Platforms for Vaccine Development. **Viruses**. ISSN 19994915. 15:5 (2023). doi: 10.3390/v15051109.
80. ZAHMANOVA, Gergana *et al.* - Plant-Derived Recombinant Vaccines against Zoonotic

Viruses. **Life**. ISSN 20751729. 12:2 (2022) 1–32. doi: 10.3390/life12020156.

81. PAGET, John *et al.* - Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. **Journal of Global Health**. ISSN 20472986. 9:2 (2019) 1–12. doi: 10.7189/jogh.09.020421.

82. RYBICKI, Edward P. - Plant-based vaccines against viruses. **Virology Journal**. ISSN 1743 422X. 11:1 (2014) 1–20. doi: 10.1186/s12985-014-0205-0.

83. KRAMMER, Florian - The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. **Nature Reviews Immunology**. ISSN 14741741. 19:6 (2019) 383–397. doi: 10.1038/s41577-019-0143-6.

84. SHAO, Wenhan *et al.* - Evolution of influenza a virus by mutation and re-assortment. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 18:8 (2017). doi: 10.3390/ijms18081650.

85. WARD, Brian J. *et al.* - Efficacy, immunogenicity, and safety of a plant-derived, quadrivalent, virus-like particle influenza vaccine in adults (18–64 years) and older adults (≥65 years): two multicentre, randomised phase 3 trials. **The Lancet**. ISSN 1474547X. 396:10261 (2020) 1491–1503. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32014-6.

86. WARD, Brian J. *et al.* - Phase III: Randomized observer-blind trial to evaluate lot-to-lot consistency of a new plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine in adults 18–49 years of age. **Vaccine**. ISSN 18732518. 39:10 (2021) 1528–1533. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.01.004.

87. PILLET, Stéphane *et al.* - A plant-derived quadrivalent virus like particle influenza vaccine induces cross-reactive antibody and T cell response in healthy adults. **Clinical Immunology**. ISSN 15217035. 168:2016) 72–87. doi: 10.1016/j.clim.2016.03.008.

88. PILLET, Stéphane *et al.* - Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and 50 years old adults. **PLoS ONE**. ISSN 19326203. 14:6 (2019). doi: 10.1371/journal.pone.0216533.

89. CHEN, Yu; LIU, Qianyun; GUO, Deyin - Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis. **Journal of Medical Virology**. ISSN 10969071. 92:4 (2020) 418–423. doi: 10.1002/jmv.25681.

90. CHARLAND, Nathalie *et al.* - Safety and immunogenicity of an AS03-adjuvanted plant-based SARS-CoV-2 vaccine in Adults with and without Comorbidities. **npj Vaccines**. ISSN

20590105. 7:1 (2022). doi: 10.1038/s41541-022-00561-2.

91. HAGER, Karen J. *et al.* - Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine. **New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 386:22 (2022) 2084–2096. doi: 10.1056/nejmoa2201300.

92. GOVERNMENT OF CANADA - **Medicago Covifenz COVID-19 vaccine** atual. 2023. Disponível em <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/covid19-industry/drugs-vaccines-treatments/vaccines/medicago.html>

93. KIRK, Dwayne D. *et al.* - Risk analysis for plant-made vaccines. **Transgenic Research**. ISSN 09628819. 14:4 (2005) 449–462. doi: 10.1007/s11248-005-5697-3.

94. HOWARD, John A; HOOD, Elizabeth - Bioindustrial and Biopharmaceutical. **Advances**. 85:2005).

95. ESMAEL, Hafiz; HIRPA, Eyob - Review on Edible Vaccine. **Academic Journal of Nutrition**. ISSN 2309-8902. 4:1 (2015) 40–49. doi: 10.5829/idosi.ajn.2015.4.1.956.

96. BHAR, Anirban - Is it possible to ensure COVID19 vaccine supply by using plants? **Nucleus (India)**. ISSN 09767975. 64:2 (2021) 137–141. doi: 10.1007/s13237-021-00361-4.

97. BUYEL, Johannes F. - Plant molecular farming – Integration and exploitation of side streams to achieve sustainable biomanufacturing. **Frontiers in Plant Science**. ISSN 1664462X. 9:January (2019) 1–17. doi: 10.3389/fpls.2018.01893.

98. BRISSE, Morgan *et al.* - Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development. **Frontiers in Immunology**. ISSN 16643224. 11:September (2020) 1–22. doi: 10.3389/fimmu.2020.583077.

99. GOLDSTEIN, Daniel A.; THOMAS, J. A. - Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. **QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians**. ISSN 14602725. 97:11 (2004) 705–716. doi: 10.1093/qjmed/hch121.

100. HUNDLEBY, Penny A. C. *et al.* - Regulation of Molecular Farming Products. **Methods in Molecular Biology**. ISSN 19406029. 2480:2022) 313–333. doi: 10.1007/978-1-0716-2241-4_17.

101. SANTOS, Rita B. *et al.* - Putting the spotlight back on plant suspension cultures. **Frontiers in Plant Science**. ISSN 1664462X. 7:MAR2016 (2016) 1–12. doi: 10.3389/fpls.2016.00297.

102. FISCHER, Rainer *et al.* - Commercial Aspects of Pharmaceutical Protein Production in

Plants. **Current Pharmaceutical Design**. ISSN 13816128. 19:31 (2013) 5471–5477. doi: 10.2174/1381612811319310002.

103. MA, Julian K. C. *et al.* - Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. **Plant Biotechnology Journal**. ISSN 14677652. 13:8 (2015) 1106–1120. doi: 10.1111/pbi.12416.

104. FISCHER, Rainer; BUYEL, Johannes F. - Molecular farming – The slope of enlightenment. **Biotechnology Advances**. ISSN 07349750. 40:August 2019 (2020) 107519. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107519.