



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

José Miguel de Almeida Regala

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Estratégias analíticas com biossensores para deteção de vírus: SARS-CoV-2 e o diagnóstico da COVID-19” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Raúl Fernando Teixeira Almeida, Dra. Joana Rita Madaleno Saraiva e do Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2022



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

José Miguel de Almeida Regala

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Estratégias analíticas com biossensores para deteção de vírus: SARS-CoV-2 e o diagnóstico da COVID-19” referente à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. Raúl Fernando Teixeira Almeida, Dra. Joana Rita Madaleno Saraiva e do Professor Doutor Rui Manuel Silva Gomes Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

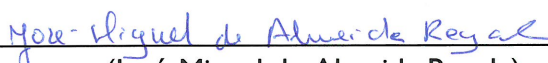
Setembro de 2022

## Declaração de autoria

Eu, José Miguel de Almeida Regala, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016230600, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada "Estratégias analíticas com biossensores para deteção de vírus: SARS-CoV-2 e o diagnóstico da COVID-19" 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, 1 de setembro de 2022.

  
\_\_\_\_\_  
(José Miguel de Almeida Regala)

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Fernanda e Paulo, por serem tudo para mim, o meu maior apoio e suporte em cada passo dado, pelos esforços que fizeram para que eu pudesse realizar tudo o que sonhava, acima de tudo por terem feito de mim a pessoa que sou hoje.

À minha família, em especial aos meus avós, Belmira, Carlos, Joaquim e Lucília, pelo apoio e carinho que tanto precisei durante esta jornada.

À Gabriela por ser a amiga de todas as horas, por ser aquela que esteve sempre presente, desde os primeiros dias até ao último. Daqui em diante, é para a vida.

Ao Costa, à Inês, ao Rua e ao Sousa, por me terem acolhido e por toda a ajuda quando mais precisei. Guardarei para sempre as noitadas de momentos e histórias.

À Carmen, ao Castro, ao Leonardo, à Margarida e ao Pancas, por serem os fiéis companheiros destes anos fantásticos que recordarei para sempre.

À Phartuna – Tuna de Farmácia de Coimbra, por ser a minha segunda família e o meu refúgio de caloiro a finalista. Nunca será um adeus.

Aos meus padrinhos e afilhadas, de faculdade e de tuna, por me terem ajudado a crescer, espero ter sido tão importante para vocês como foram para mim.

Ao Conselho de Veteranos da Universidade de Coimbra, pela confiança depositada em mim, e por me ter ensinado a viver a essência da tradição Coimbrã.

A todos os meus amigos, por terem sido parte dos melhores anos da minha vida.

Ao Raúl e à Ana, por serem os melhores “pais da farmácia”. Levarei no pensamento toda a ajuda e ensinamentos e no coração toda as palavras de carinho.

À restante equipa das Farmácias Santa Ana por serem uma peça fundamental na formação do futuro farmacêutico que serei.

À Dra. Joana Saraiva e a toda a equipa de produção da Bluepharma, por todos os ensinamentos e disponibilidade que me ofereceram.

Ao Prof. Dr. Rui Barbosa por toda a disponibilidade, tutoria e paciência, ao longo da realização da minha monografia.

A Coimbra, por tudo...

Um obrigado nunca será suficiente. FRA.

## Índice

### Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

<b>Lista de Abreviaturas / List of Abbreviations</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>9</b>
<b>2. Farmácia Santa Ana</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Análise SWOT</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1. Pontos Fortes (Strengths)</b> .....	<b>10</b>
3.1.1. Tarefas de função farmacêutica .....	10
3.1.2. Ambiente de trabalho .....	11
3.1.3. Serviços .....	11
3.1.4. Frequência de recepção de medicamentos .....	13
<b>3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Falta de otimização do sistema de gestão e atendimento .....	13
3.2.2. Desvalorização do estagiário .....	13
3.2.3. Falta de diversidade de clientes .....	14
<b>3.3. Oportunidades (Opportunities)</b> .....	<b>14</b>
3.3.1. Formações .....	14
3.3.2. Grupo de farmácias .....	14
3.3.3. Cartão de fidelização .....	14
<b>3.4. Ameaças (Threats)</b> .....	<b>15</b>
3.4.1. Plano de contingência COVID-19 .....	15
3.4.2. Preferência de atendimento .....	15
3.4.3. Fecho dos centros de saúde .....	15
<b>4. Casos Práticos</b> .....	<b>16</b>
<b>5. Conclusões</b> .....	<b>18</b>
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>19</b>

### Parte II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

<b>Lista de Abreviaturas / List of Abbreviations</b> .....	<b>21</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>22</b>
<b>2. Bluepharma</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Análise SWOT</b> .....	<b>23</b>
<b>3.1. Pontos Fortes (Strengths)</b> .....	<b>23</b>
3.1.1. Integração e ambiente .....	23
3.1.2. Formação e desenvolvimento de capacidades .....	24
3.1.3. Aquisição e consolidação de conhecimentos relativos à produção de medicamentos .....	25
3.1.4. Metodologia de trabalho .....	28
<b>3.2. Pontos Fracos (Weaknesses)</b> .....	<b>28</b>
3.2.1. Falta de espaço na fábrica .....	28
3.2.2. EPIs descartáveis e consumo excessivo de recursos .....	28
<b>3.3. Oportunidades (Opportunities)</b> .....	<b>29</b>
3.3.1. Desenvolvimento de <i>soft-skills</i> .....	29
3.3.2. Contacto com várias áreas da indústria farmacêutica .....	29
<b>3.4. Ameaças (Threats)</b> .....	<b>30</b>
3.4.1. Concorrência com profissionais de outras áreas .....	30
3.4.2. Período de estágio .....	30
<b>4. Conclusões</b> .....	<b>30</b>

**5. Referências Bibliográficas.....31**

**Parte III - Monografia "Estratégias analíticas com biossensores para  
detecção de vírus: SARS-CoV-2 e o diagnóstico da COVID-19"**

<b>1. Introdução.....</b>	<b>36</b>
<b>2. Biossensores.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1. Tipologia de biossensores com base no transdutor.....</b>	<b>38</b>
2.1.1. Biossensores eletroquímicos .....	38
2.1.2. Biossensores óticos.....	38
2.1.3. Biossensores termométricos .....	39
2.1.4. Biossensores piezoelétricos.....	39
<b>2.2. Biossensores de afinidade .....</b>	<b>39</b>
2.2.1. Biossensores de DNA/RNA .....	39
2.2.2. Imunossensores.....	40
2.2.3. Aptasensores .....	41
<b>3. Vírus e infecções virais.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. COVID-19 .....</b>	<b>42</b>
<b>4. Estratégias de detecção de vírus com recurso a biossensores .....</b>	<b>43</b>
<b>5. Estratégias de detecção de COVID-19 com recurso a biossensores .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Detecção de RNA viral .....</b>	<b>45</b>
5.1.1. Biossensores eletroquímicos .....	45
<b>5.2. Detecção de anticorpos .....</b>	<b>46</b>
5.2.1. Biossensores eletroquímicos .....	46
5.2.2. Biossensores luminescentes .....	46
<b>5.3. Detecção da partícula viral e de proteínas estruturais .....</b>	<b>46</b>
5.3.1. Biossensores eletroquímicos .....	46
5.3.2. Biossensores fluorescentes .....	47
<b>6. Métodos de detecção de referência de COVID-19.....</b>	<b>47</b>
<b>6.1. Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-PCR .....</b>	<b>48</b>
<b>6.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática, ELISA .....</b>	<b>49</b>
<b>6.3. Teste de fluxo lateral, LFA .....</b>	<b>50</b>
<b>6.4. Características das técnicas RT-PCR, LFA, ELISA.....</b>	<b>51</b>
<b>7. Estratégias analíticas futuras.....</b>	<b>52</b>
<b>8. Conclusões .....</b>	<b>53</b>
<b>9. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>55</b>

# Parte I

## Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Santa Ana



Setembro 2021 – Dezembro 2021; Abril 2022 – Maio 2022

Orientador: Dr. Raúl Almeida

## **Lista de Abreviaturas / List of Abbreviations**

**EC** – Estágio curricular / *Curricular Internship*

**FC** – Farmácia comunitária / *Community Pharmacy*

**FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra / *Faculty of Pharmacy, University of Coimbra*

**FSA** – Farmácia Santa Ana

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas / *Master's Degree in Pharmaceutical Sciences*

**PIM** – Preparação individualizada do medicamento / *Individualized drug preparation*

**SNS** – Serviço nacional de saúde / *National health system*

**SWOT** – Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades, Ameaças / *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*



## **I. Introdução**

A farmácia comunitária (FC) ou farmácia de oficina existem em Portugal desde 1449, assim como os farmacêuticos que aí exercem um papel fundamental na manutenção da saúde pública. Associados ao serviço nacional de saúde (SNS), garantem a acessibilidade ao medicamento e a equidade na prestação de cuidados de saúde de qualidade. Graças à elevada proximidade das farmácias às comunidades, sendo muitas vezes a única unidade de saúde próxima, é o farmacêutico que funciona como primeira linha de ajuda no aconselhamento e acompanhamento do doente.

Derivado do plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) integrar um estágio curricular (EC) em FC, de caráter obrigatório no último ano de estudos, é possibilitado ao estudante a experiência da realidade de uma farmácia e o acompanhamento dos farmacêuticos no seu contexto de dia-a-dia laboral, assim como a aplicação prática dos conhecimentos adquiridos ao longo dos anos anteriores.

Posto isto, tive a oportunidade de realizar o meu EC na Farmácia Santa Ana (FSA) sob orientação do Dr. Raúl Almeida, tendo este sido realizado em dois segmentos temporais, de dia 13 de setembro de 2021 a dia 7 de janeiro de 2022, e após uma interrupção de três meses para realização de um EC em indústria farmacêutica, teve retorno no dia 1 de abril de 2022 e término no dia 18 de maio de 2022.

## **2. Farmácia Santa Ana**

A FSA foi fundada a 28 de novembro de 1983 e localiza-se na freguesia de Santana, no concelho da Figueira da Foz e tem atualmente a direção técnica da Dra. Maria Inácia Chaves Teles Grilo. É composta por uma equipa dedicada e competente de farmacêuticos e técnicos de farmácia, tendo como principal objetivo “a transmissão de informação necessária para conciliar necessidades e expectativas do doente com a promoção do uso racional do medicamento”.

No ano de 2021 a FSA foi distinguida com o prémio “Almofariz Farmácia do Ano by Stada Portugal” do portal farmacêutico Netfarma.

### 3. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) que vou apresentar abaixo, tem como objetivo representar de uma forma mais completa a minha experiência de EC na FSA Seguindo as normas deste tipo de análise, irei de seguida dissertar acerca da dimensão interna - pontos fortes e fracos - e da dimensão externa - oportunidades e ameaças sentidas - do meu estágio.

**Tabela I** - Resumo da análise SWOT.

<b>Pontos Fortes (Strengths)</b>	<b>Pontos Fracos (Weaknesses)</b>	<b>Oportunidades (Opportunities)</b>	<b>Ameaças (Threats)</b>
Tarefas de função farmacêutica • Ambiente de trabalho • Serviços • Frequência de receção de medicamentos	Falta de otimização do sistema de gestão e atendimento • Desvalorização do estagiário • Falta de diversidade de clientes	Formações • Grupo de farmácias • Cartão de fidelização	Plano de contingência COVID-19 • Preferência de atendimento • Fecho dos centros de saúde

#### 3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

##### 3.1.1. Tarefas de função farmacêutica

Aquando do início do meu EC foi-me proposto uma aprendizagem e adaptação de forma gradual, começando pelas tarefas de *backoffice*, tais como, a receção de encomendas, arrumação, reposições, verificação dos prazos de validade e devoluções; após algum tempo de habituação à farmácia e aos medicamentos em si, passei para o atendimento ao balcão. Inicialmente acompanhando os colegas da equipa técnica nos seus atendimentos, observando os procedimentos a seguir, os pormenores a ter em conta para um atendimento seguro e completo, e depois fui passando a fazer atendimentos sozinho sempre com alguém disposto a

ajudar em alturas em que surgiam dúvidas, garantido continuamente o bom atendimento do utente. Pude também acompanhar tarefas de gestão e organização da farmácia, como a realização de encomendas diárias e mensais, obtenção de documentos para entregar a instituições externas para regularização de pagamentos de serviços prestados, e fecho dos receituários mensais.

### **3.1.2. Ambiente de trabalho**

A equipa técnica da FSA é composta por farmacêuticos e técnicos de farmácia, sendo uma equipa jovem, dedicada e muito competente. Desde o primeiro momento que cheguei à farmácia para realizar o meu EC que fui muito bem recebido, de forma acolhedora, e com prontidão para ajudar sempre que eu sentisse necessidade, o que tornou os meus dias de estágio muito mais confortáveis e a minha aprendizagem facilitada e fluida.

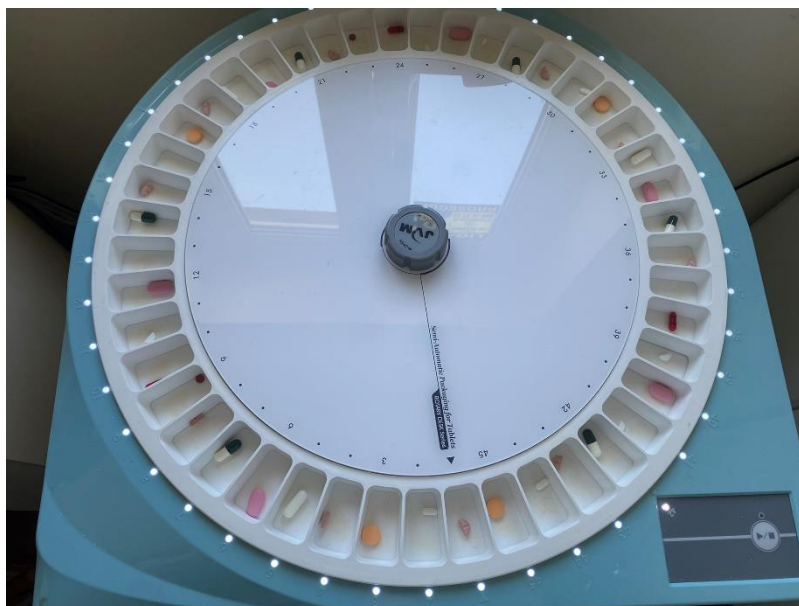
A FSA encontra-se localizada em Santana, uma pequena aldeia do concelho da Figueira da Foz, o que torna o atendimento muito pessoal, visto os utentes serem bastante regulares e vindo das localidades em volta, havendo muitos clientes conhecidos e que tornam os atendimentos mais completos já que pode haver um acompanhamento próximo do estado de saúde dos utentes por parte do farmacêutico.

### **3.1.3. Serviços**

Um dos marcos de trabalho que a FSA se orgulha de oferecer aos seus utentes, é uma vasta variedade de serviços prestados que vão ajudar imenso a população que a frequenta.

Um dos serviços mais importantes passa pela realização da preparação individualizada do medicamento (PIM). Este serviço ajuda bastante na vida dos utentes polimedicados que, nos dias de hoje, são uma realidade bastante frequente, principalmente na população mais idosa. Com este serviço assegura-se que a toma dos medicamentos é feita de uma forma correta, no horário e dia certo. Funciona a partir de um sistema informático que contem as informações médicas, previamente carregadas, e que vai passar essa informação para uma automática, que contém um tabuleiro de 45 poços, e que vai fazer a correta distribuição dos medicamentos para o espaço temporal desejado, de onde vão sair saquetas individuais com o nome, idade, medicação, dia, e respetivo período da toma. Na minha opinião este é o futuro da farmácia comunitária, permitindo uma dispensa personalizada do medicamento, consoante

as necessidades do utente, em alturas em que cada vez mais a toma regular e elevada de medicamentos é mais frequente.



**Figura I** - Máquina automática utilizada pela Farmácia Santa Ana para a PIM.

A farmácia está equipada com um gabinete de apoio ao utente, totalmente equipado, onde são realizadas medições de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, como a avaliação de colesterol, triglicerídeos, glicémia, pressão arterial, e índice de massa corporal (IMC). Este espaço é também utilizado para a administração de vacinas e injetáveis, e nesta altura de pandemia foi também utilizado para a colheita de amostras para a realização de testes rápidos de antigénio (TRAg), proporcionando um ambiente cómodo ao utente.

A FSA possui também serviços de apoio domiciliário, quer seja no deslocamento de um profissional da farmácia à casa dos utentes para esclarecimento de dúvidas e auxílio aos mais debilitados, mas também através da entrega de medicamentos e outros produtos reservados ou encomendados na farmácia, por telefone ou pelo *website* da farmácia.

Um dos serviços que se destacam na FSA é a telefarmácia, onde os profissionais de saúde, após a alguns atendimentos de especial importância e que necessitam de maior atenção, contactam os utentes após o tempo indicado para recuperação para verificar o estado de saúde e proporcionar novo aconselhamento e esclarecimento de dúvidas.

A FSA oferece também aos seus utentes, serviços de nutrição, enfermagem e podologia, assegurados por profissionais externos qualificados nas respetivas áreas, que acompanham os utentes que requerem os serviços e que melhoram a qualidade de vida de quem os procura.

Ao longo do período do meu EC pude observar e fazer parte da prestação destes serviços que tanto facilitam a vida aos utentes e demarcam a boa prestação desta farmácia.

#### **3.1.4. Frequência de receção de medicamentos**

Apesar de na farmácia não existirem todos os diferentes medicamentos de todos os laboratórios comercializados em Portugal, a FSA tem um plano de acordos com distribuidoras, como Plural+Udifar e a OCP Portugal, que asseguram a entrega diária das encomendas realizadas, e um acordo com a Empifarma para entrega bidiária, sendo que da parte da manhã são entregues as encomendas realizadas até às 21h do dia anterior, e da parte da manhã são feitas as entregas das encomendas feitas até às 12h desse mesmo dia. Isto garante uma constante reposição de *stocks*, assim como, a satisfação da necessidade de utentes que tomam algo que não se encontra na farmácia no momento da visita, podendo levantar o medicamento no período seguinte ou o mesmo será entregue em casa.

### **3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)**

#### **3.2.1. Falta de otimização do sistema de gestão e atendimento**

Um aspeto negativo que pude constatar ao longo do meu percurso de EC foi as dificuldades do sistema de gestão e atendimento Sifarma 2000<sup>®</sup> e o novo módulo de atendimento Sifarma<sup>®</sup>, da Glintt<sup>®</sup>. Trata-se do programa mais utilizado nas farmácias portuguesas, mas apesar disso ainda apresenta algumas que podem comprometer o funcionamento da farmácia e o bom atendimento do utente. A maior falha encontra-se em alguma falta de comunicação e transmissão de dados entre o Sifarma 2000<sup>®</sup>, que é o programa mais antigo e que era o mais utilizado, e o novo sistema mais recente, acabando por vezes levar a constrangimentos. Algo que condiciona a utilização de apenas um programa, é que este mais recente não possui ainda as ferramentas completas, acabando por ter de ser necessário a utilização de dois sistemas o que complica o dia-a-dia de atendimento e gestão de recursos.

#### **3.2.2. Desvalorização do estagiário**

Algo que verifiquei no início do meu EC é a visão do público geral perante os estagiários de uma farmácia, mostrando algumas vezes desconfiança e descredibilizando as recomendações que são fornecidas por nós. Esta situação leva, por vezes, o utente a preferir ser atendido por outro colega, na qual já têm melhor confiança, não ajudando na aprendizagem do futuro farmacêutico. Esta situação é mais marcada na FSA por estar localizada num ambiente rural, onde os clientes conhecem bem a equipa da farmácia.

Felizmente, ao longo do meu tempo ao balcão, fui conseguindo captar a confiança dos utentes, demonstrando as minhas capacidades técnicas e sociais, fazendo com que, a partir de uma certa altura, fosse de total confiança tal como qualquer outro colaborador da farmácia.

### **3.2.3. Falta de diversidade de clientes**

A FSA encontra-se inserida num meio pequeno, sendo que a população frequente da farmácia seja praticamente a idosa e de idade adulta, não havendo praticamente atendimentos com idades mais jovens, como recém-mães com bebés, sendo muito difícil aconselhar gamas para bebés, ou com adolescentes, não tendo tido, por exemplo, nenhuma oportunidade de contactar com a necessidade da dispensa de uma pílula do dia seguinte.

## **3.3. Oportunidades (*Opportunities*)**

### **3.3.1. Formações**

Durante o meu EC pude estar presente para assistir a várias formações teóricas, por parte de delegados de informação médica, que se revelaram bastante enriquecedoras e úteis para o meu conhecimento, melhorando o meu aconselhamento para os utentes.

Tenho a destacar a formação realizada pela Aflofarm, acerca do produto Dextazin<sup>®</sup>, que é um medicamento para cessação tabágica de venda exclusiva em farmácia, algo que nos dias de hoje é algo limitado no mercado português e que é de elevada importância para a saúde das comunidades.

### **3.3.2. Grupo de farmácias**

A FSA neste momento encontra-se incluída num grupo de três farmácias do mesmo proprietário, onde encontramos também a Farmácia Santa Ana Jardim, na Figueira da Foz, e a Farmácia Santa Ana Graça, na localidade da Abrunheira, concelho de Montemor-o-Velho. Isto proporciona uma comunicação constante entre os profissionais de saúde que aí exercem, com uma persistente troca de ideias e interajuda em situações especiais de atendimento, fazendo com que a experiência para a pessoa que visite uma das farmácias seja o mais completa e satisfatória possível. Isto possibilita também uma fidelização de um vasto número de utentes na área de residência onde as farmácias se encontram, acabando por ser um marca cada vez mais familiar no distrito de Coimbra.

### **3.3.3. Cartão de fidelização**

A FSA possui, como forma de captar e fidelizar clientes ao grupo Santa Ana, um cartão de fidelização, providenciando descontos e vantagens exclusivas, que podem ser utilizados em qualquer uma das farmácias.

### **3.4. Ameaças (*Threats*)**

#### **3.4.1. Plano de contingência COVID-19**

O meu EC decorreu numa altura algo crítica no contexto pandémico que foi vivido a nível global, trazendo para as populações inúmeras restrições e condicionalismos para a vida das mesmas. O que mais foi sentido por mim, foi a utilização obrigatória de máscara dentro das farmácias, o que nas populações envelhecidas condicionava bastante a comunicação farmacêutico-doente, quer fosse pela falta de audição ou mesmo pela falta de contacto mais pessoal, algo muito valorizado pelos mais idosos.

Algo que acho senti durante o meu EC, foi a procura em massa por TRAg realizados na farmácia, que providenciavam um certificado de testagem, que em algumas ocasiões temporais, era obrigatório para a utilização de certos serviços e estabelecimentos. Isto proporcionou que durante alguns meses a maioria das pessoas que frequentavam a farmácia era para a realização dos mesmos, condicionando um pouco o atendimento farmacêutico para os casos de aconselhamento, devido à elevada afluência que existiu.

#### **3.4.2. Preferência de atendimento**

Certos utentes regulares, já habituados a frequentar a FSA, por vezes requeriam ser atendidos por um colaborador específico, o que por vezes causava momentos de confusão na farmácia ou alguma fila de espera, devido a muitas vezes o colaborador não estar disponível no momento. Isto é também prejudicial para o bom funcionamento da farmácia e para o trabalho dos colegas requeridos, que muitas vezes se encontravam a realizar outras tarefas que não o atendimento ao balcão, e que tinham de colocar em pausa o que estavam a fazer, para ir realizar aquele atendimento.

#### **3.4.3. Fecho dos centros de saúde**

No concelho da Figueira da Foz tem se vindo a verificar um recorrente fecho dos centros de saúde em redor da FSA, com o intuito de centralizar as populações para o centro de saúde das Alhadas, uma localidade que se encontra um pouco distante da farmácia, e que possui farmácias mais bem localizadas, acabando por alguns utentes optar por se deslocarem à farmácia mais perto, por uma questão de comodidade.

## **4. Casos Práticos**

### **Caso Prático 1**

Utente do sexo masculino, na casa dos 40 anos, entra na farmácia com queixas de sintomatologia gripal, predominantemente tosse seca. Após análise das queixas do utente e derivado da situação pandémica em que nos encontrávamos, aconselhei um teste rápido de antigénio para despistar uma eventual doença de COVID-19. Após alguma relutância da parte do utente, alegando que era muito improvável que fosse uma contaminação por SARS-CoV-2, foi realizado o teste na farmácia. Após a espera dos 15 minutos necessários para a obtenção do veredito do teste, este demonstrou um resultado positivo.

Na sequência do resultado, procedi à medição da saturação de  $O_2$  e da temperatura corporal, sendo que apresentou valores normais, não sendo causa de alarme, e novamente inquiri o utente se possuía mais algum sintoma a relatar, na qual este deu uma resposta negativa.

Foi então indicado para o utente um xarope antitússico à base de dextrometorfano, para combate dos sintomas de tosse seca, para toma de 15 ml com intervalos de 6 a 8 horas, e que este contactasse a linha de saúde 24 (SNS24), que é a linha de contacto do SNS, para posterior indicação de obrigatoriedade da realização de isolamento profilático por parte do utente.

### **Caso Prático 2**

Senhora com sensivelmente 20 anos, chega ao balcão da farmácia com sintomatologia ligeira de uma infeção urinária, e pede para realizar um teste para despiste da doença. Para tal, aconselhei a realização de um teste qualitativo de urina, que faz uma análise de 10 parâmetros, nomeadamente aos leucócitos, nitritos, urobiliniogênio, albumina, ph, hemoglobina, gravidade específica, ácido acetilacético, bilirrubina e glicose, que podem ser indicadores de uma infeção bacteriana a nível do trato urinário. O teste demonstrou níveis elevados de leucócitos (++) , nitritos (++) e hemoglobina (++) , podendo aferir que se trata de um resultado positivo, e que estávamos na presença de uma infeção urinaria na jovem senhora.

Para combate da infeção que apenas apresentava sintomas ligeiros, foi aconselhado à doente, uma suplementação à base de arandos associada com um suplemento de vitamina C. Foi também aconselhado medidas não farmacológicas, como a ingestão de muita água, evitar o uso de roupa interior sintética, e a utilização de produtos adequados de higiene íntima diária, para ajudar a acelerar o desaparecimento da infeção e a diminuição dos sintomas. Foi também



aconselhado à utente que levasse consigo um medicamento antiespasmódico, um combinado de butilescopolamina e paracetamol, para toma em SOS caso existisse o surgimento de espasmos, que são muito comuns neste tipo de infeções. Caso os sintomas não desaparecessem passado alguns dias, recomendei que a mesma se deslocasse ao médico de família para reavaliação.

### **Caso Prático 3**

Um senhor dirigiu-se à farmácia, pedindo ajuda para uma questão veterinária. Este diz que o seu cão, com cerca de 10 kg, há cerca de 2 semanas começou a coçar-se muito, apresentando prurido e peladas localizadas ao longo do dorso do animal, o que indicaria uma dermatose.

Foi questionado ao senhor se sabia qual a causa dos sintomas, na qual este respondeu que não suspeita de nada.

Aconselhei então, para tentar resolver o problema do cão, um champô dermocalmante, de digluconato de clorhexidina + miconazol, aplicando uma a duas vezes por semana até o desaparecimento dos sintomas, assim como uma suplementação com um complexo derme dietético de ómega 3, 6 e 9, com toma de 2 cápsulas por dia, para ajudar a recuperar o vigor e integridade da pele e do pelo do animal.

### **Caso Prático 4**

Uma utente do sexo feminino, com aproximadamente 50 anos, chega à farmácia com queixas de varizes nas pernas. Varizes são derivadas do fenómeno de refluxo venoso, que acumula sangue nas veias por causa de uma incapacidade de fecho das válvulas das veias, tornando-as dilatadas e tortuosas.

Foi questionado à utente se tem histórico de doenças cardiovasculares ou se toma algum tipo de medicação, na qual esta respondeu negativamente, mas queixou-se que com o calor costuma sentir as pernas mais cansadas e inchadas.

Para tratamento do síndrome varicoso, foi aconselhado um gel heparinóide, de polissulfato de mucopolissacáridos, para aplicar várias vezes ao dia na zona das varizes, associado com um medicamento venotrópico à base de bioflavonóides, com uma toma diária de um comprimido de 1000 mg. Aconselhei também umas de meias de compressão para melhoria do retorno venoso e conseqüente alívio dos sintomas.

Após uma semana da visita, efetuei um serviço de telefarmácia, telefonando à utente para questionar se houve melhorias com o tratamento, na qual respondeu que sim, e que se sentia muito mais aliviada e com menos sinais de síndrome varicosa.

### **Caso Prático 5**

Um senhor de meia-idade entra na farmácia com a queixa de estar há alguns dias com diarreia.

Após questionar se este sente outros sintomas como febre ou dores abdominais, aconselhei uma toma única diária de suplemento alimentar com bifidolactus, FOS (fruto-oligossacáridos) e vitaminas B<sub>12</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub> em toma concomitante com um antidiarreico não obstipante liofilizado de *Lactobacillus*, sendo que este deve ser tomado 2 cápsulas três vezes ao dia no primeiro dia, e nos dias seguintes 2 cápsulas duas vezes ao dia.

### **5. Conclusões**

Sendo a área da farmácia comunitária aquela que mais alberga farmacêuticos, e que se apresenta como o primeiro apoio em algumas populações, acho que este EC é de uma elevada importância para a formação de um farmacêutico, mesmo que o mesmo não siga essa área de trabalho, acabando por se mostrar bastante enriquecedor em aspetos que vão ser bastante úteis na minha vida profissional futura, como por exemplo o elevado grau de relação que é estabelecido entre utente e farmacêutico, desenvolvendo capacidades de comunicação e trabalho.

Concluindo, posso dizer que tive uma experiência muito positiva no meu EC em farmácia comunitária, muito graças à equipa da FSA, que me proporcionaram um ótimo ambiente de trabalho, sempre demonstrando total disponibilidade para ajudar no meu desenvolvimento pessoal e curricular, no qual estou muito grato, e sinto que saí deste estágio muito bem preparado caso o meu futuro farmacêutico passe pela farmácia comunitária.

## 6. Referências Bibliográficas

Ordem dos farmacêuticos – **Farmácia comunitária** - [Consultado a 8 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

Farmácia Santa Ana – **Sobre Nós** – [Consultado a 8 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.farmaciasantana.com.pt/sobre-nos/>

Farmácia Santa Ana – **Serviços** – [Consultado a 8 de agosto de 2022]. Disponível em: <https://www.farmaciasantana.com.pt/servicos/>

Ordem dos farmacêuticos - **Norma Geral de Preparação Individualizada da Medicação (PIM)** [Consultado a 15 de agosto de 2022]. Disponível em: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma\\_pim\\_vfinal\\_30\\_nge\\_00\\_010\\_02\\_1834827175bf58d479434f.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_pim_vfinal_30_nge_00_010_02_1834827175bf58d479434f.pdf)

# Parte II

## Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.



Janeiro 2022 – Março 2022

Orientadora: Dra. Joana Saraiva

## **Lista de Abreviaturas / List of Abbreviations**

- API** – Substância Ativa / *Active Pharmaceutical Ingredient*
- BLPH** – Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A.
- CQ** – Controlo de Qualidade / *Quality Control*
- EC** – Estágio Curricular / *Curricular Internship*
- EPI** – Equipamento de Proteção Individual / *Personal Protective Equipment*
- FF** – Formas Farmacêuticas / *Pharmaceutical Forms*
- FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra / *Faculty of Pharmacy, University of Coimbra*
- GMP** – Boas Práticas de Fabrico / *Good Manufacturing Practice*
- IF** – Indústria Farmacêutica / *Pharmaceutical Industry*
- IPC** – Controlo Durante o Processo / *In Process Control*
- LOD** – Perda durante a secagem / *Loss On Drying*
- MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas / *Master's Degree in Pharmaceutical Sciences*
- OPL** – *One Point Lesson*
- PSA** – Produto Semi-Acabado / *Semi-Finished Product*
- RF** – Registo de Fabrico / *Manufacturing Registration*
- SOP** – Procedimento Operacional Normalizado / *Standard Operating Procedure*
- SWOT** – Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades, Ameaças / *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **1. Introdução**

O plano de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) possibilita aos seus integrantes o contacto com diversas áreas profissionais do ramo farmacêutico, formando profissionais que conhecem e percebem o medicamento em todo o seu ciclo de vida e que podem, assim, intervir em qualquer que seja a fase em que o mesmo se encontre.

A nível pessoal sempre considerei a hipótese de integrar a indústria farmacêutica (IF) como alternativa à tradicional farmácia comunitária. Tendo em conta os meus gostos pessoais e a possibilidade oferecida pela FFUC para realização de Estágio Curricular (EC), candidatei-me à Bluepharma Indústria Farmacêutica, S.A. (BLPH), ao departamento de Fabricação. Neste fui colocado e orientado pela Dra. Joana Saraiva, assim como acompanhado pela equipa de supervisores- composta por farmacêuticos e operadores seniores- cuja vasta experiência me permitiu enriquecer o meu conhecimento e desenvolver o gosto pela área de produção de medicamentos.

O estágio teve uma duração de aproximadamente 3 meses, tendo como data de início o dia 10 de janeiro de 2022 e data de término o dia 31 de março de 2022.

## **2. Bluepharma**

A Bluepharma foi fundada em fevereiro de 2001, após um grupo visionário de profissionais da área ter adquirido as instalações, localizadas em São Martinho do Bispo (Coimbra) e propriedade da indústria alemã Bayer, a qual iria terminar a sua atividade em Portugal.

Nos dias de hoje a BLPH foca a sua atividade em três áreas do medicamento: produção; investigação, desenvolvimento e registo; e comercialização de genéricos.

No seu dia-a-dia, a empresa funciona baseando-se em valores bem estabelecidos, no sentido de providenciar e assegurar que os medicamentos que chegam ao mercado são de qualidade, seguros, de fácil acesso à população que deles necessita e que estão em constante inovação e melhoramento, quer ao nível do seu fabrico, quer da sua comercialização.

### 3. Análise SWOT

A análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*) que vou apresentar abaixo, tem como objetivo representar de uma forma mais completa a minha experiência de EC na Blph. Seguindo as normas deste tipo de análise, irei de seguida dissertar acerca da dimensão interna - pontos fortes e fracos - e da dimensão externa - oportunidades e ameaças sentidas - do meu estágio.

**Tabela I** - Resumo da análise SWOT.

<b>Pontos Fortes (Strengths)</b>	<b>Pontos Fracos (Weaknesses)</b>	<b>Oportunidades (Opportunities)</b>	<b>Ameaças (Threats)</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>Integração e ambiente</li><li>•</li><li>Formação e desenvolvimento de capacidades</li><li>•</li><li>Aquisição e consolidação de conhecimentos relativos à produção de medicamentos</li><li>•</li><li>Metodologia de trabalho</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Falta de espaço na fábrica</li><li>•</li><li>EPIs descartáveis e consumo excessivo de recursos</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Desenvolvimento de <i>soft-skills</i></li><li>•</li><li>Contacto com várias áreas da indústria farmacêutica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>Concorrência com profissionais de outras áreas</li><li>•</li><li>Período de estágio</li></ul>

#### 3.1. Pontos Fortes (*Strengths*)

##### 3.1.1. Integração e ambiente

O acolhimento na BLPH encontra-se já bastante bem estabelecido e estruturado, conseguindo a empresa receber os seus novos estagiários de forma organizada. Inicialmente, no primeiro dia, existe uma sessão de apresentação geral da empresa e respetiva organização interna, realizada pelo departamento de Recursos Humanos. Após o seu término, é atribuído

a cada novo elemento um tutor, normalmente alguém experiente com bastante conhecimento “da casa”, que tem como função apresentar o departamento e a equipa ao novo estagiário, assim como esclarecer todas as dúvidas que surjam durante o seu período de estágio.

Quanto à equipa da Fabricação, departamento onde fui colocado, o acolhimento aconteceu de forma exemplar, tanto por parte dos supervisores, ao explicarem a dinâmica e o funcionamento geral da produção e me colocarem à vontade para expor todas as questões relativas ao seu trabalho diário, como por parte dos operadores, que sempre se mostraram disponíveis para me elucidar acerca das suas tarefas e de todo o funcionamento prático associado à produção dos medicamentos, não só ao nível do processo em si, mas também dos equipamentos inseridos nessa função.

Algo que acho muito importante realçar é toda a simpatia e pré-disposição a ajudar por parte, não só, do pessoal do departamento da Fabricação, mas também dos restantes departamentos, com os quais existe contacto diário. Esta dinâmica facilita o dia-a-dia de aprendizagem de qualquer estagiário, tornando um ambiente desconhecido num local confortável, e permitindo que cresça nos estudantes o gosto por aprender todos os dias coisas novas na nossa área de interesse.

### **3.1.2. Formação e desenvolvimento de capacidades**

Na BLPH, desde o dia de receção até ao dia de saída, existe uma vasta oferta de formação teórica e prática relativas aos processos que envolvem o fabrico de medicamentos. Aliando a estas as oportunidades de aprendizagem envolvendo outros departamentos, de suporte e restantes, este estágio torna-se muito completo.

Abordando a minha experiência, na semana em que entrei para o departamento da fabricação acompanhei de perto todos os processos de fabrico do medicamento, passando deste modo por um período de adaptação ao chão de fábrica, à equipa, à dinâmica do departamento e aos processos propriamente ditos, e adquirindo ainda um contexto geral daqueles que seriam os três meses seguintes.

Obrigatoriamente, quando alguém entra na empresa para exercer qualquer função, tem de realizar diversas formações teóricas, com posterior avaliação de retenção de conhecimentos, antes de principiar o referido trabalho. Os temas destas formações passam por boas práticas de fabrico (GMP), assuntos regulamentares, *overview* da Fabricação, entre outros, sendo que periodicamente é necessária a revisão dos conceitos mais importantes relativos ao correto cumprimento de cada função. A par destas formações é mandatória ainda a leitura dos Procedimentos Operacionais Normalizados (SOPs), relativos aos conceitos gerais



e específicos do respetivo departamento em que se é incluído. Esta leitura torna-se muito mais fácil de perceber e de contextualizar devido ao período de adaptação que é permitido aos novos elementos, sendo possível comparar aquilo que foi observado com as normas escritas.

Após leitura dos documentos referidos, foi-me possível passar para a fase que mais me cativa: a parte prática, na qual pude “por mãos à obra” e acompanhar o funcionamento diário de uma fábrica. Esta aprendizagem foi possível através do acompanhamento diário das funções de dois cargos diferentes: operador, o qual me permitiu desenvolver novas capacidades que irão ser muito úteis no futuro, tais como o contacto com a mecânica de máquinas, o desenvolvimento de metodologias de trabalho, a importância do trabalho de equipa, entre outros; e supervisor, cargo em que se inserem os farmacêuticos neste departamento, os quais por sua vez me mostraram e ajudaram a desenvolver capacidades de liderança, de organização e de resolução de problemas inesperados, assim como de gestão de recursos humanos, visto serem responsáveis por dezenas de operadores.

### **3.1.3. Aquisição e consolidação de conhecimentos relativos à produção de medicamentos.**

Na BLPH, quando do meu período de EC, apenas se procedia à produção de dois tipos de formas farmacêuticas (FF) sólidas orais: comprimidos e cápsulas. Apesar de no plano curricular do MICF se encontrarem unidades curriculares, nomeadamente as de Tecnologia Farmacêutica, nas quais são apresentados e demonstrados os processos de fabrico da maioria das FFs, estes são abordados à escala laboratorial e, por vezes, de forma breve e pouco aprofundada. Assim, a passagem para a escala industrial torna-se uma nova aprendizagem da maioria das técnicas e processos a esta associados.

Ambas as FF partilham no seu processo de produção várias etapas em comum. Abaixo tentarei expor de forma simples, não obstante o mais completa possível, este processo de produção.

Tudo se inicia pela libertação da ordem de fabrico, na qual, após análise e aprovação das matérias-primas pelo Controlo de Qualidade (CQ), é atribuído um número a cada lote de medicamentos e são impressos os respetivos registos de fabrico (RF). Nestes, serão elaborados os cálculos de acerto necessários, tendo em conta o teor de água e o grau de pureza da substância ativa (API), e por base as análises apresentadas pelo CQ. Após este passo, as matérias-primas são libertadas e enviadas pelo armazém para as salas de pesagem. Esta é realizada em duas salas, em cada uma das quais existe uma câmara de fluxo laminar vertical, uma balança de bancada, na qual são realizadas as pesagens na ordem das gramas (g), e uma balança de chão, para as pesagens na ordem dos quilogramas (kg). A pesagem é então realizada,

de forma sequencial e normalizada, sendo que só pode estar dentro da sala uma matéria-prima de cada vez, excipientes e API. Imperiosamente, o API tem de ser pesado em último lugar, de forma a evitar contaminações cruzadas, dado que a maioria dos excipientes são usados em diferentes lotes, ou seja, em produtos diferentes.

Feita a pesagem, as matérias-primas são encaminhadas para uma área de reserva, onde irão ficar até serem transportadas para as salas dos processos seguintes, nomeadamente, granulação e mistura. No que respeita à granulação, esta pode ser de dois tipos diferentes:

- Granulação via húmida:

É através deste procedimento que a maioria das matérias-primas são granuladas. Uma vez chegadas à sala respetiva, estas são carregadas para uma misturadora/granuladora, sendo que nas instalações encontramos três equipamentos diferentes, tendo dois deles capacidade para 600 L, e outra mais reduzida com capacidade para 250 L, e são misturadas com solução de granulação previamente preparada, com o auxílio de forças de torque e amassamento. No próximo passo, o granulado obtido passa para um equipamento de leito de ar fluidizado, com o objetivo de eliminar a humidade em excesso. Esta, é controlada periodicamente, de 30 minutos em 30 minutos ou de hora a hora, consoante a fase de secagem em que se encontra o produto, e através de valores obtidos na LOD (*Loss On Drying*). Após serem atingidos os valores de humidade estabelecidos no respetivo RF, o granulado é calibrado para garantir uniformidade.

- Granulação via seca:

Este processo é utilizado com menos frequência, particularmente quando as matérias-primas têm propriedades termosensíveis e sensíveis à humidade, não podendo assim passar pelo processo de granulação húmida. É então utilizado um compactador de rolos, pelos quais o pó, ou mistura de pós, passam, formando placas compactas que após trituração e calibração permitem a obtenção dos grânulos desejados.

Após esta fase, o granulado já devidamente calibrado passa para a sala de misturas, onde são adicionados os restantes componentes quando existe fase externa a adicionar, e na qual o produto é finalmente uniformizado. Esta homogeneidade de pós é um passo crítico para a qualidade do produto final. Com os pós já prontos, chegamos à fase em que os processos de fabrico diferem, consoante a FF a produzir.

### **Comprimidos**

No caso dos comprimidos, a fase seguinte é a de formação dos mesmos, ou seja, a compressão. Existem vários tipos de máquinas compressoras, entre os quais diferem o número de punções e o rendimento final da produção. Estes instrumentos estão equipados

com torres de compressão distintas, as quais condicionam diferentes tamanhos de comprimidos.

Antes de começar o processo propriamente dito, é necessária uma correta e cuidadosa montagem da máquina, começando pela montagem dos punções, matrizes e guias, adequadas ao produto em questão, e não esquecendo o despoeirador e o detetor de metais, equipamentos externos à máquina. A alimentação é feita, de forma geral, verticalmente, sendo que o contentor que possui a mistura final é acoplado à boca de alimentação da máquina. Em certos casos, a alimentação poderá ser feita de forma manual, mas não usualmente. É ainda possível que a compressora tenha a funcionalidade de alimentação por vácuo, caso no qual não será necessária a alimentação vertical.

Após o processo de montagem, procede-se ao ajuste da máquina, para que as especificações do RF (peso individual, dureza, espessura e comprimento, friabilidade e tempo de desagregação do comprimido) sejam cumpridas, e aos testes de funcionamento e rejeição, utilizados para aferir o bom funcionamento da leitura das forças da compressora. Verificando que tudo se encontra dentro da conformidade, dá-se início à produção.

De forma a confirmar a estabilidade da compressão, são realizados IPCs (*In Process Control*) com uma periodicidade definida pelo RF. Caso exista algum parâmetro fora dos limites estabelecidos, é interrompida a produção para reajustes da máquina. O operador é bastante importante nesta fase do processo, visto que deve estar atento a fenómenos como *sticking* ou *capping* nos comprimidos, o chamado controlo ótico, assim como às condições em torno da máquina compressora, seja a pressão diferencial, a temperatura ou a humidade relativa.

Após o término da produção dos comprimidos, na maioria dos casos estes passam por um processo de revestimento, o qual pode ter um objetivo funcional, como a modificação do perfil de libertação, a estabilidade do produto, ou outro; ou estético, como a modificação do aspeto exterior, com o objetivo de, por exemplo, facilitar a adesão à terapêutica do doente. Este processo inicia-se com o carregamento dos comprimidos não revestidos no tambor da máquina de revestimento, onde ficam em estado estacionário enquanto a temperatura aumenta. Alcançada a temperatura estabelecida no RF, começa a fase de revestimento propriamente dita, e várias pistolas de aspersão debitam sobre os comprimidos a solução/suspensão/ água de revestimento. É importante notar que, neste processo, os valores da velocidade de débito, temperatura de ar de entrada e velocidade de rotação do tambor devem ser os previamente definidos no RF. Quando os comprimidos atingem o valor de peso ideal, inicia-se o processo de secagem e posterior descarga, após atingirem um valor de temperatura próximo dos 25°C, ou seja, da temperatura ambiente.

Depois de o revestimento estar completo, os comprimidos revestidos seguem para a área de embalagem, onde se procederá ao acondicionamento primário e secundário.

### **Cápsulas**

No caso das cápsulas, o processo é bastante mais simples, sendo que passa apenas pelo enchimento de cápsulas/ encapsulamento. Este processo assemelha-se bastante ao de compressão, no qual a alimentação é feita verticalmente e está presente um detetor de metais. O encapsulamento conta também com a presença de um selecionador de cápsulas, que verifica a presença de cápsulas que não cumprem as especificações pretendidas. Por fim, existe ainda controlo durante o processo através de IPCs e de controlo ótico das cápsulas e, após o enchimento das mesmas, estas passam diretamente para o departamento de embalagem.

#### **3.1.4. Metodologia de trabalho**

Algo que me cativou bastante durante o meu EC foi a metodologia de trabalho implementada, em toda a empresa, mas especialmente no departamento da Produção. Existe bastante cuidado durante todas as etapas do processo de fabrico das várias FF, começando na abertura do RF do mesmo e só cessando quando o medicamento chega ao cliente. Sempre que se procede a uma determinada ação, de alguém envolvido no fabrico dos produtos, esta é registada em tempo real e procede-se à sua confirmação por parte de um dos supervisores, no RF, durante todo o ciclo de produção. Estas particularidades garantem um controlo minucioso das ações dos operadores e reduzem os desvios de fabrico que possam acontecer acidentalmente, ou por negligência. Todos os documentos relativos a IPCs, protocolos de pesagem, relatórios das máquinas, etiquetas de limpeza de sala ou equipamento, são anexados ao RF, para futura análise do CQ. Caso se encontre tudo corretamente efetuado, o medicamento pode finalmente ser libertado para o cliente.

### **3.2. Pontos Fracos (*Weaknesses*)**

#### **3.2.1. Falta de espaço na fábrica**

Uma das queixas recorrentes ao longo do meu EC, tanto por parte dos operadores, como dos supervisores e de todo o pessoal presente na fábrica de produção, é a limitante falta de espaço dentro da fábrica, o que dificulta bastante o trabalho de todos os envolvidos, assim como o rendimento diário.

#### **3.2.2. EPIs descartáveis e consumo excessivo de recursos**

Apesar de ser algo necessário e importante para assegurar a segurança dos operadores e evitar contaminações, a maioria dos equipamentos de proteção individual (EPI) de utilização

diária são descartáveis e têm de ser retirados e eliminados quando se muda de produto ou muda de sala, tal como referido, para evitar contaminações cruzadas.

Outro aspeto que verifiquei é a constante utilização de sacos plásticos para condicionamento provisório das matérias-primas e do produto semi-acabado (PSA), sendo que estes mudam quando se muda de processo. Por exemplo, os sacos que recebem os comprimidos não revestidos não serão os mesmo que vão receber os comprimidos revestidos, acabando por se gastar quantidades enormes de plástico apenas num produto. Considero que isto deve ser algo repensado, para que seja encontrada uma alternativa funcional e sustentável.

### **3.3. Oportunidades (*Opportunities*)**

#### **3.3.1. Desenvolvimento de *soft-skills***

Ao longo do EC, e através do contacto com uma grande variedade de postos de trabalho e de cargos de responsabilidade, consegui desenvolver capacidades que me irão ser muito úteis no futuro, não só no âmbito profissional, mas também na minha vida pessoal.

Foi-me proporcionada a possibilidade de desenvolver capacidades como a reação a imprevistos, dado que era necessário resolver problemas com a maior rapidez e eficácia possível, e o trabalho de equipa inter e intradepartamental, uma vez que era necessário haver contacto constante com os colegas de departamento e com a restante empresa para que tudo ocorresse da melhor forma possível. Tive ainda a oportunidade de evoluir em aspetos como a metodização de trabalho, a atenção aos detalhes e a gestão de recursos humanos, visto serem os supervisores os responsáveis pelo destacamento dos operadores nos diferentes processos, consoante as suas capacidades e formações, e ainda por definir as equipas dos diferentes turnos e os horários de refeição de cada um.

#### **3.3.2. Contacto com várias áreas da industria farmacêutica**

Durante o estágio em fabricação existe um contacto constante com todos os departamentos envolventes e de suporte, nomeadamente com o que cada um faz no seu dia-a-dia e com as suas responsabilidades. Assim, é oferecida aos estagiários uma perspetiva bastante abrangente do funcionamento de uma IF, a qual me permitirá, no futuro, escolher qual o rumo que irei tomar no meu percurso profissional tendo uma ideia do que cada departamento da IF realiza.

### **3.4. Ameaças (Threats)**

#### **3.4.1. Concorrência com profissionais de outras áreas**

Algo que verifiquei na IF onde estagiei é a presença de profissionais de áreas científicas que não a farmacêutica, em cargos que os farmacêuticos estão capacitados para desempenhar. Isto põe em causa o seguimento de algumas carreiras na área da indústria, visto que as oportunidades são, *ad initio*, limitadas, e a isto acresce a sua abrangência a outro tipo de profissionais.

#### **3.4.2. Período de estágio**

Os estágios propostos pela FFUC, nomeadamente no MICF, proporcionam uma experiência maior ao aluno integrante, algo que não acontece em todas as faculdades de farmácia do país. No entanto, por vezes estes estágios têm, ainda assim, uma duração relativamente curta para que o estagiário se possa envolver em algum projeto a médio-longo prazo na empresa em que se integra. Assim, os estagiários do MICF têm de realizar tarefas mais simples ou de menor importância, comparativamente a outros mestrados que possuem estágios de maior duração, ainda que, por vezes, de menor interesse para o estagiário.

## **4. Conclusões**

Resumindo a minha experiência neste EC, considero ter sido algo bastante positivo na minha formação profissional, e só tenho a agradecer à equipa da produção todo o apoio e a oportunidade que me deram de poder integrar e vivenciar, durante os 3 meses de estágio, o dia-a-dia de um farmacêutico em ambiente industrial. Termino assim este estágio com a confirmação de que o ambiente de chão de fábrica e produção do medicamento é uma das portas da área farmacêutica que ficaria realizado e feliz em prosseguir.

Finalmente, termino este estágio com a esperança de que todas as experiências e desafios passados tenham sido um sucesso e que façam do meu “eu” profissional um farmacêutico mais completo. Por tudo isto, posso afirmar estar realizado pessoalmente.

## 5. Referências Bibliográficas

Bluepharma - **Quem somos** - [Consultado a 7 de maio de 2022]. Disponível em:  
<https://www.bluepharma.pt/about-us.php>

Bluepharma - **Missão, Visão e Valores** - [Consultado a 7 de maio de 2022]. Disponível em:  
<https://www.bluepharma.pt/about-mvv.php>

Bluepharma - **Fabrico** - [Consultado a 7 de junho de 2022]. Disponível em:  
<https://www.bluepharma.pt/manufacturing/production.php>

Bluepharma - **Compressão** - [Consultado a 7 de junho 2022]. Disponível em:  
<https://www.bluepharma.pt/manufacturing/productioncompression.php>

Bluepharma - **Enchimento de Cápsulas** - [Consultado a 7 de junho de 2022]. Disponível em:  
<https://www.bluepharma.pt/manufacturing/productionencapsulation.php>

Bluepharma - **Revestimento** - [Consultado a 7 junho de 2022]. Disponível em:  
<https://www.bluepharma.pt/manufacturing/productioncoating.php>

# **Parte III**

## **Monografia**

**“Estratégias analíticas com biossensores para deteção de vírus: SARS-CoV-2  
e o diagnóstico da COVID-19”**

**Orientador: Professor Doutor Rui M. Barbosa**



## **Lista de Abreviaturas / List of Abbreviations**

- ACE2** – Enzima conversora de angiotensina 2 / *Angiotensin-converting enzyme 2*
- AIDS** – Síndrome de imunodeficiência adquirida / *Acquired immune deficiency syndrome*
- COVID-19** – Doença do coronavírus 2019 / *Coronavirus disease 2019*
- DNA** – Ácido desoxirribonucleico / *Deoxyribonucleic acid*
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática / *enzyme-linked immunosorbent assay*
- HIV** – Vírus da imunodeficiência humana / *Human immunodeficiency virus*
- HPV** – Papilomavírus humano / *Human papillomavirus*
- ICVCN** – Código Internacional de Classificação e Nomenclatura de Vírus / *International Code of Virus Classification and Nomenclature*
- LFA** – Teste de fluxo lateral / *Lateral flow assay*
- LOD** – Limite de detecção / *Limit of detection*
- MERS** – Síndrome respiratória do médio oriente / *Middle east respiratory syndrome*
- PCR** – Reação de polimerização em cadeia / *Polymerase chain reaction*
- PGA** – Ácido poligloico / *Polyglycolic acid*
- POC** – *Point-of-care*
- POCT** – *Point-of-care Testing*
- QCM** – Microbalança de cristal de quartzo / *Quartz crystal microbalance*
- RBD** – Domínio de ligação ao recetor / *Receptor binding domain*
- RNA** – Ácido ribonucleico / *Ribonucleic acid*
- RT** – Transcrição reversa / *Reverse transcription*
- SWV** – Voltametria de onda quadrada / *Square wave voltammetry*
- TC** – Tomografia computadorizada / *Computed tomography*
- WHO** – Organização mundial de saúde / *World health organization*

## Resumo

Os biossensores, ou sensores bioquímicos, são dispositivos analíticos que incorporam um elemento de bio reconhecimento ou um bio-recetor em contacto com a superfície de um transdutor. Através da incorporação de biossensores em instrumentos analíticos inovadores pode haver uma deteção eficaz de vírus que causam doenças contagiosas e danosas para saúde humana. Devido à elevada exigência para que haja uma resposta rápida no combate às doenças, há a necessidade de desenvolvimento metodologias desenvolvidas que cheguem de forma acessível e com rapidez a todas as populações, com o objetivo de controlar da melhor forma a disseminação de doenças através da tecnologia disponível. Este trabalho sumariza as características dos biossensores, bem como do vírus SARS-CoV-2. Além disso apresenta vários biossensores consoante a tipologia de tipo de transdutor e de alvo de deteção. Depois aborda também os métodos de diagnóstico de COVID-19 mais utilizados e eficazes. Por fim apresenta algumas perspetivas futuras de deteção de SARS-CoV-2.

**Palavras-chave:** biossensores, SARS-CoV-2, vírus, *point-of-care*, especificidade, sensibilidade.

## **Abstract**

Biosensors, or biochemical sensors, are analytical devices that incorporate a bio-recognition element or a biosensor in contact with the surface of a transducer. By incorporating biosensors into innovative analytical instruments there can be effective detection of viruses that cause contagious diseases and damage to human health. Due to the high demand for a quick response in fighting diseases, there is a need to develop methodologies that reach all populations in an accessible way and quickly, in order to best control the spread of diseases through the available technology. This paper summarizes the characteristics of biosensors as well as the SARS-CoV-2 virus. It also presents various biosensors according to the type of transducer and detection target. Then it also discusses the most widely used and effective methods for diagnosing COVID-19. Finally, it presents some future perspectives of SARS-CoV-2 detection.

**Keywords:** biosensors, SARS-CoV-2, virus, point-of-care, specificity, sensitivity.

## **1. Introdução**

Ao longo dos tempos têm surgido doenças de natureza viral de grande relevância e impacto na saúde humana, como as hepatites, ébola, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), papilomavírus humano (HPV), síndrome respiratória do médio oriente (MERS) e mais recentemente, a doença do coronavírus de 2019 (COVID-19), que têm exposto inúmeras debilidades dos sistemas de saúde e da sua resposta a doenças inesperadas, e consequentemente, estimulam avanços clínicos e tecnologias médicas. Estas doenças causam sérios problemas de saúde global e individual, provocando milhares de mortes e trazendo um impacto enorme nas comunidades a nível socioeconómico.<sup>[1,2]</sup>

Devido ao crescente aumento da velocidade de surgimento de novos vírus e doenças, ou o reaparecimento de certos agentes patogénicos que se julgavam controlados ou extintos, cada vez mais são necessários métodos de testagem eficazes, sensíveis, rápidos, e acima de tudo acessíveis a toda a população, de forma a proporcionar um maior controlo da propagação dessas doenças. Em casos pandémicos, o diagnóstico precoce dos casos e o seu tratamento associado pode ser determinante e diferenciador no grau de extensão e severidade das consequências.<sup>[1,2]</sup>

Como não é possível prever o tipo de vírus que emergem, é importante estabelecer pilares sólidos nas metodologias de deteção de doenças, para que depois se possa adaptar, de forma rápida e eficaz, as técnicas pré-existentes a novos casos. Estas vão diferir consoante as características biológicas dos microrganismos. É através destas propriedades que se desenvolvem biossensores, mais ou menos específicos, que vão ser fundamentais no sistema de reconhecimento dos vírus.<sup>[3]</sup>

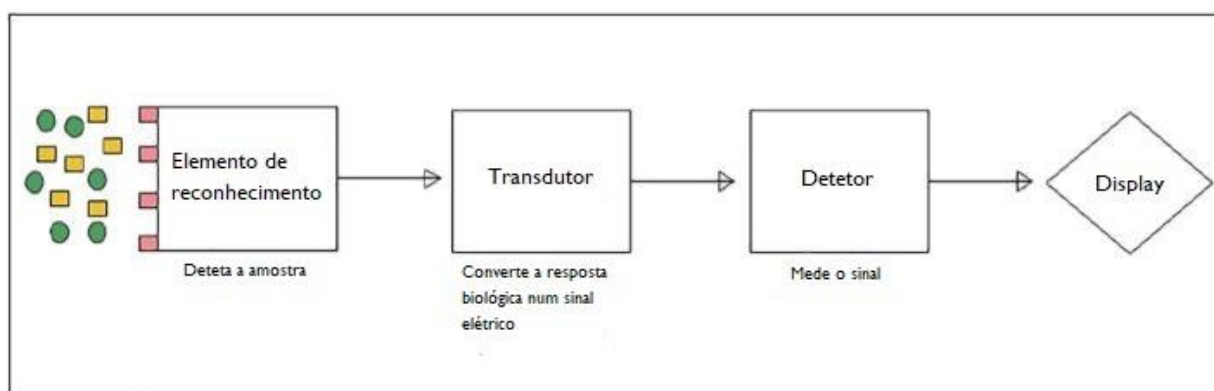
Posto isto, é de extrema importância que haja uma colaboração de todos os ramos científicos e da área da saúde no controlo e contenção destas doenças, de forma a que se encontrem respostas efetivas que evitem desastres globais.<sup>[2]</sup>

## **2. Biossensores**

Os biossensores, ou sensores bioquímicos, são dispositivos analíticos que incorporam um elemento de reconhecimento biológico ou um bio-recetor em contacto com a superfície de um transdutor. São capazes de detetar várias substâncias de natureza biológica ou química e integram, além do bio-recetor e transdutores, outros componentes eletrónicos de processamento e leitura do sinal produzido pelo analito. São caracterizados por conjugarem

a sensibilidade e especificidade biológicas com transdutores físico-químicos convertendo metodologias bioanalíticas complexas em formatos simples e fáceis de utilizar. Podem ser utilizados em várias áreas de interesse de saúde pública, desde o diagnóstico clínico, descoberta de novos medicamentos, monitorização ambiental e controlo de qualidade alimentar.<sup>[4,5]</sup>

Nas últimas décadas, com os avanços tecnológicos e médicos, a evolução e desenvolvimento de biossensores tem tido um acréscimo significativo. Dentro do campo dos biossensores encontramos normalmente uma divisão em duas grandes categorias: os mais complexos e sofisticados, que apresentam um alto rendimento com recurso a material laboratorial, tornando-os mais caros mas também mais rápidos e eficazes, sendo capazes de medir e compreender interações complexas; e aqueles que são fáceis de usar, demarcando-se por serem portáteis e acessíveis ao público em geral, e que são capazes de ser utilizados em casa, sem a necessidade de um conhecimento especializado por parte do operador.<sup>[4]</sup>



**Figura 1** - Diagrama de blocos com os componentes principais de um biossensor. (Adaptada de [6])

Para o desenvolvimento de uma metodologia viável através de biossensores, é necessário que estes preencham certos requisitos. É crucial para a boa performance analítica dos mesmos, que detenham as seguintes características:

- Seletividade/especificidade, sejam capazes de detetar, exclusivamente, o analito em estudo;
- Sensibilidade e LOD, com a capacidade de detetar pequenas variações na concentração de biomarcadores, ou detetar a presença desses traços analíticos em baixas concentrações de analito;
- Linearidade, correspondente ao intervalo de concentração de resposta linear obtido pela calibração;
- Apresentem um rápido tempo de resposta;

- Reprodutibilidade em larga escala, assegurando que os resultados são sempre fiáveis;
- Estabilidade, conseguindo ignorar fatores internos ou externos que possam ter um impacto negativo na análise e obtenção de resultados.<sup>[5,6]</sup>

A manutenção da saúde das populações é um dos grandes objetivos da evolução tecnológica na área das ciências da saúde, e por isso, o desenvolvimento de biossensores capazes de detetar várias doenças é também um foco de investigação. Infelizmente a maioria destas metodologias convencionais é invasiva para o paciente, visto ser necessário a colheita de uma amostra biológica, normalmente, sangue ou exsudados nasofaríngeos, o que se torna um obstáculo em algumas faixas etárias, que por uma questão de conforto para os doentes, é necessário o desenvolvimento de estratégias alternativas.<sup>[4,7]</sup>

Os biossensores funcionam através da identificação de elementos biológicos, sejam biomarcadores ou enzimas, com base em sistemas de transdução e reconhecimento. O elemento de reconhecimento interage com o analito em análise e produz um sinal que vai ser convertido pelo transdutor num sinal elétrico exibido posteriormente no sistema de leitura ou *display*. Equipamentos que utilizam transdutores, possuem uma vasta capacidade de deteção, e por isso, têm tido cada vez mais aplicações, sendo os mais utilizados na deteção de infeções virais, graças à sua alta performance, portabilidade, simplicidade e baixo custo.<sup>[4,6]</sup>

## **2.1. Tipologia de biossensores com base no transdutor**

### **2.1.1. Biossensores eletroquímicos**

Biossensores de transdução eletroquímica são o tipo de sensores mais investigados e utilizados. Funcionam com base nas propriedades eletroquímicas dos analitos e do transdutor, apresentando uma elevada sensibilidade e seletividade. O analito liga-se ao bio-recetor imobilizado na superfície do transdutor, produzindo um sinal elétrico que vai ser posteriormente analisado. Os biossensores voltamétricos/amperométricos são os mais comuns, mas podemos ter ainda biossensores eletroquímicos potenciométricos ou impedimétricos.<sup>[5]</sup>

### **2.1.2. Biossensores óticos**

Este tipo de biossensores funcionam através de um elemento biológico de reconhecimento integrado num transdutor ótico. O princípio de um biossensor ótico assenta na geração de um sinal proporcional à concentração de analito permitindo uma deteção sem uso de marcadores. No processo de transdução, é induzida uma alteração de características no analito em resposta a estímulos físicos ou químicos provocados pelo elemento de

reconhecimento. Os biossensores óticos mais utilizados são de base fluorimétrica, quimioluminescência, ou ainda, com bastante importância comercial, os de ressonância de plasmão de superfície (*surface plasmon resonance-SPR*).<sup>[5]</sup>

### **2.1.3. Biossensores termométricos**

Biossensores de transdução termométrica têm por base as reações endotérmicas ou exotérmicas para medição, por exemplo, de calor absorvido ou libertado durante esses processos. Estes biossensores usam, normalmente, uma técnica de análise por injeção em fluxo através de uma medição de variação de temperatura ao longo de um reator enzimático. O sinal térmico gerado durante a reação é proporcional à concentração de substrato. Estes podem ser calorimétricos ou termométricos.<sup>[5]</sup>

### **2.1.4. Biossensores piezoelétricos**

Biossensores piezoelétricos funcionam em resposta a variações de massa do material de ligação, como proteínas ou anticorpos à superfície, produzindo uma variação na frequência de ressonância de vibração de um cristal de quartzo, que conseqüentemente vibra a uma frequência específica, frequência essa que vai ser posteriormente detetada e analisada.<sup>[5]</sup>

## **2.2. Biossensores de afinidade**

### **2.2.1. Biossensores de DNA/RNA**

Os biossensores de DNA/RNA, também designados de genossensores, são frequentemente utilizados para detecção de doenças virais ou bacterianas, mediante análise do seu material genético. Estes utilizam sondas de DNA ou RNA como elemento de reconhecimento, através de reações de hibridização entre DNA-DNA ou entre DNA-RNA. Estas ligações fornecem uma elevada especificidade e permitem uma análise direta em amostras biológicas muito complexas. Estes apresentam várias vantagens comparando com outras técnicas, sendo elas, entre outras, a simplicidade de método e a rápida obtenção de resultados.<sup>[1]</sup>

Dentro dos diferentes tipos de genossensores, as diferenças surgem no processo de transdução, podendo ser, ótico, piezoelétrico ou eletroquímico. Os biossensores eletroquímicos são os mais utilizados, devido à facilidade com que se podem miniaturizar, à sua portabilidade, elevada sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção (LOD) e à ausência de necessidade de um pré-tratamento da amostra. Os avanços tecnológicos recentes dos genossensores têm sido feitos com base nas seguintes estratégias:<sup>[1]</sup>

- Método de imobilização de DNA, que consiste na modificação química dos eletrodos na base da construção do biossensor, com o objetivo de reter de forma eficaz o material genético à superfície do transdutor, incorporando materiais sintéticos ou naturais, proporcionando melhor condutividade, seletividade, especificidade, sensibilidade, e permitindo uma hibridização mais eficiente. A quantidade de DNA retido na superfície do transdutor é proporcional à disponibilidade de locais de ligação do analito. Esta incorporação pode ser obtida através de diferentes métodos como, adsorção, ligação covalente ou por reticulação, sendo que esta última, é a mais utilizada graças à sua elevada eficácia.<sup>[1]</sup>
- Design detection (estratégia de detecção), através da incorporação de uma substância conhecida e facilmente detetável, um marcador (*label*), numa sonda “repórter”, formando uma estrutura do tipo *sandwich* entre a sonda de captura e o alvo, variando a resposta analítica consoante a presença e quantidade de marcador.<sup>[1]</sup>
- Amplificação de sinal, em particular para os biossensores menos sensíveis, na análise de fluidos biológicos. Posto isto, existe uma amplificação do alvo ou do sinal gerado pela espécie *label*. Um exemplo bastante conhecido e utilizado de amplificação na detecção de vírus é o método *reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction* (RT-PCR), que é caracterizado por uma elevada sensibilidade e especificidade.<sup>[1]</sup>

Apesar das vantagens apresentadas por estes biossensores, o complexo processo de modificação que é necessário para imobilizar os ácidos nucleicos na superfície do sensor e a limitada flexibilidade são motivos de ponderação aquando da sua utilização.<sup>[8]</sup>

### **2.2.2. Imunossensores**

Imunossensores têm sido utilizados para detetar diferentes tipos de vírus, sendo que são considerados métodos alternativos e complementares ao tradicional RT-PCR graças à sua elevada sensibilidade e especificidade. Estes biossensores convertem um sinal das reações imunoquímicas num sinal mensurável, proporcional à concentração de analito. Tal como os genossensores, os imunossensores podem ser eletroquímicos, óticos ou piezoelétricos.<sup>[1]</sup>

Os imunossensores eletroquímicos têm sido bastantes usados na detecção de doenças virais, sendo candidatos ideais para produção de dispositivos *point-of-care* (POC), devido a características favoráveis como, sensibilidade e seletividade, rápida obtenção de resultados e bom custo-benefício.<sup>[1]</sup>

Este tipo de biossensores reconhecem quer antigénios, quer anticorpos. No caso dos antigénios, normalmente, são detetadas glicoproteínas presentes na superfície dos vírus que são as responsáveis pela ligação às células hospedeiras. Aquando da detecção de anticorpos,



são detetadas imunoglobulinas específicas produzidas pelo corpo humano em resposta à infeção, sendo que estas podem permanecer no corpo durante um longo espaço de tempo.<sup>[1]</sup>

### 2.2.3. Aptasensores

Estes tipos de biossensores utilizam aptâmeros, que são nucleótidos artificiais de cadeia simples (*single-stranded*) capazes de se ligarem a alvos biológicos próprios, como proteínas, células, vírus, etc. São compostos por centenas destes nucleótidos e produzidos por síntese, através de estratégias de ligação, lavagem e amplificação. Estes possibilitam também uma modificação mais simples de grupos funcionais sem perda da atividade biológica, mantendo-se estáveis e com um baixo custo de produção.<sup>[1,9]</sup>

Apesar dos métodos de construção serem muito diferentes dos genossensores, as estratégias de modificação podem ser utilizadas em ambos.<sup>[1]</sup> A vantagem que estes trazem em relação aos anteriores é a capacidade de se adaptarem a altas temperaturas, valores de pH e elevadas concentrações iónicas.<sup>[9]</sup>

A estratégia mais utilizada de deteção é a funcionalização do aptâmero com uma molécula marcadora e outra imobilizadora numa tira de DNA. Os aptâmeros podem também ser conjugados com polímeros, e incorporados em métodos fluorométricos ou colorimétricos, devido às suas propriedades óticas.<sup>[9]</sup>

## 3. Vírus e infeções virais

Vírus são agentes patogénicos, à escala nanométrica, capazes de infetar todo o tipo de seres vivos. Biologicamente têm um ciclo de vida intracelular obrigatório e possuem um genoma de DNA ou RNA. Estes utilizam estratégias de síntese e replicação à base de apropriação das células do indivíduo que infetam.<sup>[10,11]</sup>

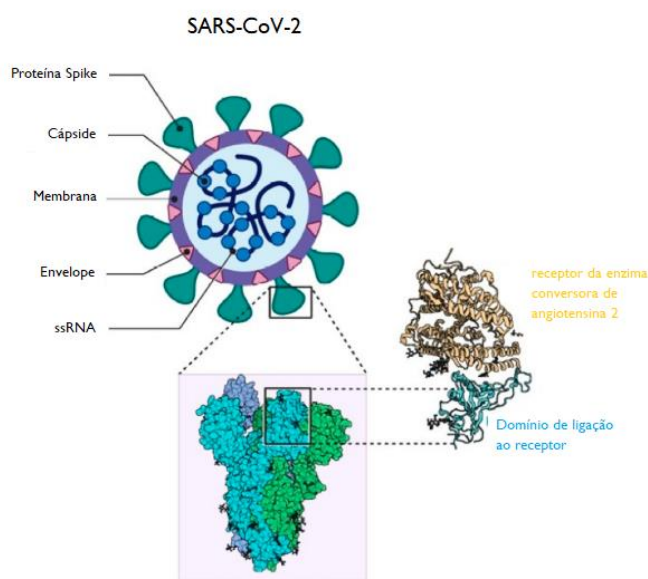
Estes microrganismos apresentam um número reduzido de genes responsáveis pela infeção, estando habitualmente encapsulados num envelope lipídico ou numa cápside proteica, e são fundamentais para a determinação do alcance do hospedeiro e da sua composição antigénica viral. Outro aspeto muito importante na constituição dos mesmos são as glicoproteínas espiga (*spike*), presentes no exterior da membrana viral, e que fazem o contacto entre o vírus e as células do hospedeiro.<sup>[1,11]</sup>

Com base nas características biológicas de cada um, são categorizados em diferentes classes, através do sistema de classificação denominado *International Code of Virus Classification and Nomenclature* (ICVCN), onde existem duas grandes divisões taxonómicas, uma onde se

situam os vírus com genoma à base de DNA (DNA vírus), e a outra, onde estão aqueles que possuem genoma à base de RNA (RNA vírus). Com base nestas duas classes *major* encontramos uma organização mais específica, sendo agrupados por ordem, família, género e espécie.<sup>[10]</sup>

### 3.1. COVID-19

Dentro da família dos coronavírus, encontramos o causador da maior pandemia do século XXI, o vírus SARS-CoV-2, responsável pela COVID-19. Foi pela primeira vez detetado na província chinesa de Wuhan em dezembro de 2019, tendo sido conseguido uma sequenciação completa do seu genoma em janeiro de 2020. Derivado do elevadíssimo grau de transmissibilidade do vírus, apenas dois meses depois, no mês de março de 2020, foi declarada pandemia pela organização mundial de saúde, trazendo assim inúmeras restrições e consequências em todo o planeta, tendo sido reportados acima de 548 milhões de casos positivos de infeção, incluindo mais de 6 milhões de mortes em todos os seis continentes.<sup>(3,12,13)</sup>



**Figura 2** - Vista estrutural do vírus SARS-CoV-2 e a respetiva proteína de superfície. (Adaptada de [3])

Aquando do seu aparecimento, pessoas infetadas foram analisadas através de uma técnica *multiplex* PCR, com referência de vários vírus patogénicos já conhecidos, sendo que apenas foi sequenciado quando foi utilizado uma técnica de nova geração de análise de RNA. O genoma do vírus mostrou-se similar ao já conhecido SARS-CoV, que tinha surgido em 2002, e por isso recebeu o nome de SARS-CoV-2. Estruturalmente é muito semelhante a coronavírus pré-existentes, como o responsável pela MERS, tendo, normalmente, uma forma esférica, com a possibilidade de pleomorfismo. O seu diâmetro ronda, em média, os 125 nm,

compreendido entre valores de 60 nm a 140 nm, e a sua conformação é ilustrada na Figura 2.<sup>[3,14]</sup>

O vírus SARS-Cov-2 dispõe de um genoma de cadeia simples de RNA (ssRNA) e possui na sua constituição quatro proteínas estruturais muito importantes para o seu processo de fusão e replicação: E (proteína do envelope), M (proteína membrana), N (proteína da cápside) e S (proteína *spike*); sendo que as proteínas S e N podem ser utilizadas como biomarcadores específicos para diferenciação entre espécies de coronavírus. Possui também a nível da proteína S, duas subunidades, os recetores da enzima conversora de angiotensina 2 e domínios de ligação ao recetor (RBD).<sup>[1,15]</sup>

A nível celular, o processo de infeção do vírus consiste numa interação proteína-proteína, entre a proteína *spike* do vírus e a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que é o recetor presente na superfície da célula do hospedeiro. Quando o vírus consegue penetrar nas células, o material genético é replicado e convertido em proteínas que posteriormente vão dar origem a descendência viral.<sup>[3,15]</sup>

A compreensão das características biológicas do vírus foram fundamentais para o desenvolvimento de metodologias de deteção da doença.<sup>[14]</sup>

#### **4. Estratégias de deteção de vírus com recurso a biossensores**

No estudo de vírus de relevância elevada para a saúde humana podem ser utilizados biossensores com vários tipos e estratégias diferentes, adaptados às características biológicas dos vírus, e consoante as necessidades emergentes são desenvolvidos para uso laboratorial ou em modalidade point-of-care testing (POCT). Abaixo são apresentados alguns exemplos de biossensores desenvolvidos para deteção de diferentes patologias.<sup>[4]</sup>

Foi desenvolvido um biossensor piezoelétrico que se foca na pesquisa de ácidos nucleicos para deteção do vírus da hepatite B (HBV). O biossensor baseou-se numa microbalança de cristal de quartzo (QCM), em virtude de vantagens como, alta sensibilidade de massa, fácil funcionalização para obtenção de uma boa especificidade, resposta rápida, e um baixo custo de produção. Envolve um método de uma única etapa (*single step*) e sem marcadores (*label free*) para deteção do genoma de HBV, através de hibridização do alvo com sondas de DNA de cadeia simples imobilizadas em superfícies de ouro (Au) na balança de cristal de quartzo. Este demonstrou uma sensibilidade e um tempo de resposta adequados para se tornar um ótimo candidato a sensor POCT para deteção rápida e direta de hepatite B.<sup>[16]</sup>

Foi também preparado um biossensor inovador à base de ácido poliglicólico (PGA) para detecção do genótipo I do vírus da hepatite C (HCV1a). Trata-se de uma metodologia simples, sem a necessidade da presença de marcadores, para detecção de sequências oligonucleotídicas do vírus HCV1a, através de uma sonda de inosida imobilizada, numa superfície de PGA, através de ligações covalentes. Após imobilização, houve hibridização com as sequências complementares respetivas, e posterior monitorização dos resultados através de voltametria de onda quadrada (SWV). O biossensor em estudo apresentou baixo limite de detecção (LOD) (40,6 nM), amplo intervalo de linearidade (50 nM – 1,0 µM), boa sensibilidade e reprodutibilidade.<sup>[17]</sup>

## **5. Estratégias de detecção de COVID-19 com recurso a biossensores**

A COVID-19 é uma doença altamente contagiosa, transmitida através de gotículas no ar e pelo contacto entre humanos. Os sintomas podem ser facilmente confundidos com os de outros vírus, como o influenza, e por isso a sua detecção pode ter alguns entraves, sendo na maioria das vezes atrasado o diagnóstico, o que leva a um elevado risco de contágio e consequente maior propagação do vírus.<sup>[3]</sup>

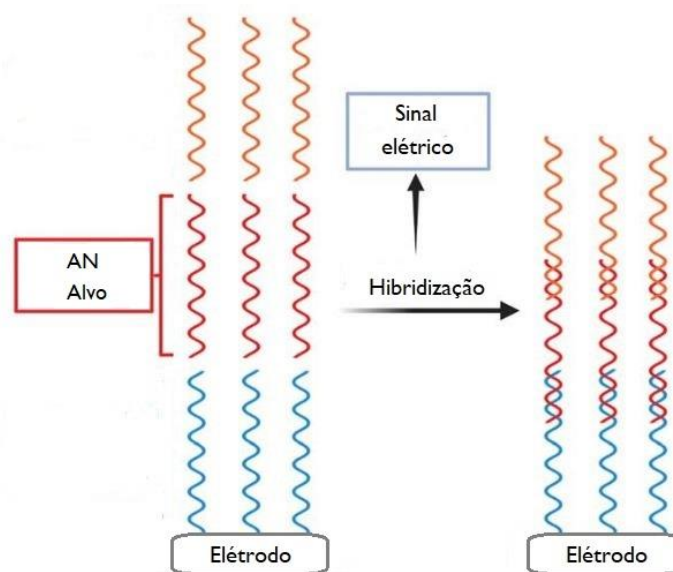
A detecção de SARS-CoV-2 define-se em três vertentes: a detecção do vírus, a detecção do RNA/DNA viral, e detecção de anticorpos; sendo que estas podem também ser úteis na atribuição de prognóstico médico, descoberta de novos medicamentos e análise do bom funcionamento da terapêutica medicamentosa instaurada ao doente.<sup>[1,3]</sup>

Vários tipos de biossensores podem ser utilizados para o diagnóstico de COVID-19, sendo que os eletroquímicos são os mais utilizados derivado do seu baixo custo, facilidade de utilização e aptidão para a produção em grande escala. Devido à fraca atividade eletroquímica das moléculas, por vezes é necessário adicionar marcadores (*labels*) para obter uma amplificação do sinal analítico.<sup>[18]</sup>

## 5.1. Detecção de RNA viral

### 5.1.1. Biossensores eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos para a detecção de RNA utilizam uma técnica de hibridização entre ácidos nucleicos de cadeia simples e as suas cadeias complementares. O conceito de funcionamento do biossensor é baseado na hibridização entre dois ácidos nucleicos de cadeia simples complementares, e conversão desta detecção num sinal elétrico mensurável. O processo de hibridização pode ocorrer à superfície do eletrodo ou em solução.<sup>[18]</sup>



**Figura 3** - Representação básica de um biossensor eletroquímico para detecção de sequências de ácidos nucleicos. (Adaptada de [18])

Um aspeto crítico em biossensores eletroquímicos que detetam sequências de ácidos nucleicos é a seleção de pequenas porções de cópias de DNA ou RNA na amostra. Para resolver este problema é muito importante selecionar um método de amplificação de sinal que seja eficaz. Dentro das técnicas moleculares de amplificação encontramos três categorias, amplificação isotérmica mediada por enzimas, nanomateriais usados como marcadores, e associação de enzimas ao sistema de hibridização de ácidos nucleicos.<sup>[18]</sup>

Recentemente, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico com recurso a grafeno, uma forma de carbono nanoestruturado, e com base num sistema seletivo de cadeias simples de DNA (ssDNA), para detecção do gene N de SARS-CoV-2. O DNA foi imobilizado à superfície do transdutor, e o sinal obtido amplificado e processado para fácil leitura do sinal eletroquímico. A incorporação de nanopartículas de ouro (Au) aumentou a sensibilidade do biossensor, que com um tempo de incubação inferior a 5 minutos, apresentou valores de 23 l cópias/ $\mu$ L e um limite de detecção (LOD) de 6,9 cópias/ $\mu$ L em amostras nasais e de saliva.<sup>[19]</sup>

## 5.2. Detecção de anticorpos

### 5.2.1. Biossensores eletroquímicos

Para o diagnóstico da COVID-19 através da detecção de anticorpos imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG) foi incorporado um eléctrodo impresso do tipo papel. O papel funciona como substrato, e graças ao seu baixo custo e facilidade de eliminação evita contaminação viral cruzada. O funcionamento deste biossensor consiste na imobilização de proteína S com um RBD, e posterior detecção eletroquímica do complexo antígeno-anticorpo formado. Esta metodologia apresentou um tempo de resposta de 30 min, um LOD de 1 ng/ml, e uma elevada sensibilidade (100%) e especificidade (90%) em amostras serológicas de doentes infetados com SARS-CoV-2.<sup>[20]</sup>

Foi também desenvolvida uma plataforma à base de nanomateriais para a detecção de anticorpos de SARS-CoV-2. Esta contém eléctrodos conseguidos através de tecnologia de impressão 3D de nanopartículas. O eléctrodo produzido é coberto de óxido de grafeno reduzido e revestido por antígenos imobilizados anti-SARS-CoV2, específicos para proteína S e para RBD. O eléctrodo foi combinado num dispositivo microfluídico que possui uma célula eletroquímica. As interações entre antígenos e anticorpos foram detetadas por espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS). Este método apresentou LODs para a proteína S e RBD de, 2,8 fM e 16,9 fM respetivamente, apresentando um tempo de teste muito rápido, na ordem dos segundos.<sup>[21]</sup>

### 5.2.2. Biossensores luminescentes

Para detecção de várias patologias foi desenvolvido um biossensor luminescente a partir da fusão de dois fragmentos da enzima nanoluciferase (NanoLuc), as subunidades *small* BiT (SmBit) e *large* BiT (LgBiT). Funcionam através da característica das imunoglobulinas possuírem dois locais de ligação a antígenos, e com a incubação da mistura das duas subunidades com soro humano, vai haver uma ligação a estes locais com posterior fusão dos fragmentos conexos, originando o complexo NanoLuc, que ao ser reduzido, emite um sinal luminescente. Esta metodologia mostrou ser bastante rápida (~5 min), precisa (~98%) e sensível na detecção de anticorpos anti-SARS-CoV-2 e proteína N.<sup>[22]</sup>

## 5.3. Detecção da partícula viral e de proteínas estruturais

### 5.3.1. Biossensores eletroquímicos

Foi reportado um biossensor inovador que combina fibras de algodão com métodos eletroquímicos para detecção de SARS-CoV-2. Este imunossensor eletroquímico com extremidade de algodão funciona, simultaneamente, como coletor e detetor. Esta metodologia

é conseguida através da imobilização de antígeno de proteína N na superfície de um eletrodo *screen-printed* de carbono. A detecção do antígeno viral foi feita através de um mecanismo competitivo que utiliza uma concentração fixa de anticorpos em solução, sendo posteriormente captado o sinal através de voltametria de onda quadrada. O biossensor apresentou uma boa seletividade, e LOD de 0,8 pg/ml, permitindo uma detecção rápida, simples e de baixo custo, sem ser necessário pré-preparação ou pré-tratamento da amostra.<sup>[15]</sup>

A detecção da partícula de SARS-CoV-2 foi também estudada através de um método que envolve um eletrodo modificado por *sensorchip*. Esta estratégia integra um sensor que transporta um anticorpo de ligação carregado negativamente, que se encontra conjugado a um DNA *linker* equipado com uma sonda redox, até ao analito. Após a aplicação de um potencial positivo, o *chip* move-se segundo a superfície do eletrodo. A detecção é feita por cronoamperometria, graças ao aumento da resistência ao fluxo do sensor por parte das partículas. Este método foi dado como efetivo na detecção de SARS-CoV-2 e da proteína S em amostras de controlo e em amostras de saliva de doentes, com um tempo de teste de 5 minutos.<sup>[23]</sup>

### **5.3.2. Biossensores fluorescentes**

Um imunossensor fluorescente para detecção de proteína N de SARS-CoV-2 foi desenvolvido a partir da inclusão de fluoróforos (indicador fluorescente), e avalia o sinal produzido pelo analito através de microscopia fluorescente. Este é constituído por uma cassete que conta com uma amostra previamente extraída combinada com anticorpos monoclonais contra o vírus SARS-CoV-2 conjugados com fluoróforos. O analisador fluorescente vai medir a quantidade de fluorescência provocada pela formação de complexos anticorpo-antígeno após a incubação. Este teste demora 30 minutos para realizar, apresentando uma sensibilidade de, aproximadamente, 47%.<sup>[24]</sup>

## **6. Métodos de detecção de referência de COVID-19**

As pessoas infetadas com o vírus SARS-CoV-2 apresentam uma série de sintomas comuns a outras doenças respiratórias, como febre, tosse e falta de ar, havendo também a possibilidade da existência de portadores assintomáticos, tornando-se por isso necessário um rápido controlo e contenção do vírus, quer seja com metodologias de referência laboratoriais ou com testes rápidos POCT (*point-of-care testing*) para o diagnóstico da doença.<sup>[25]</sup>

O diagnóstico da COVID-19 é feito através de técnicas moleculares, que se baseiam na determinação de RNA viral, sendo o método de referência para SARS-CoV-2, o teste de

*reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction* (RT-PCR), que consiste na detecção de sequências específicas do vírus, podendo também ser identificado através de testes de imunoabsorção enzimática (ELISA) e testes POC *lateral flow assay* (LFA), que detetam biomarcadores em amostras. Estes podem ser complementados por exames de tomografia computadorizada (TC), servindo de confirmação em casos particulares.<sup>[1,18]</sup>

Devido ao aumento exponencial dos casos em países muito populosos, a disponibilidade e acessibilidade aos testes por RT-PCR passou a estar comprometida e os diagnósticos com maior sensibilidade e seletividade deixaram de ser facilmente acessíveis, e por isso, foi necessário o desenvolvimento e validação de metodologias rápidas, que apresentassem sensibilidade e seletividade adequadas e que prevenissem falsos resultados. Os testes POC oferecem assim uma melhoria de rapidez no rastreio da doença combinado com uma ótima relação custo-eficácia.<sup>[2,25]</sup>

### **6.1. Quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-PCR**

O método de *reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction* (RT-PCR) consiste na determinação da presença de RNA viral em amostras biológicas colhidas do trato respiratório superior. Utiliza tecnologia *polymerase chain reaction* (PCR) para converter pequenas quantidades de RNA em sequências de DNA que vai ser posteriormente replicado, até ser detetado e confirmada a presença do vírus SARS-CoV-2.<sup>[26,27]</sup>

Para o diagnóstico da infeção é necessário que seja feita uma colheita de amostra de fluido biológico de uma via respiratória superior (nasofaringe) ou inferior (orofaringe), locais onde o vírus se aloja, sendo um passo determinante com enorme influência na sensibilidade do teste. Após colheita o fluido é filtrado e é isolado o RNA viral. A partir desse RNA é gerado um DNA viral complementar (cDNA) por intermédio da transcriptase reversa, onde regiões específicas vão sofrer uma reação de polimerização em cadeia (PCR) para amplificação e posterior incorporação de um marcador de DNA com um isótopo radioativo ou um marcador fluorescente, numa parte específica do cDNA. Se forem detetadas cópias de cDNA, produzidas por intermédio da enzima DNA polimerase, é sinal de que o vírus se encontra presente na amostra, e é produzido um sinal fluorescente.<sup>[1,3]</sup>

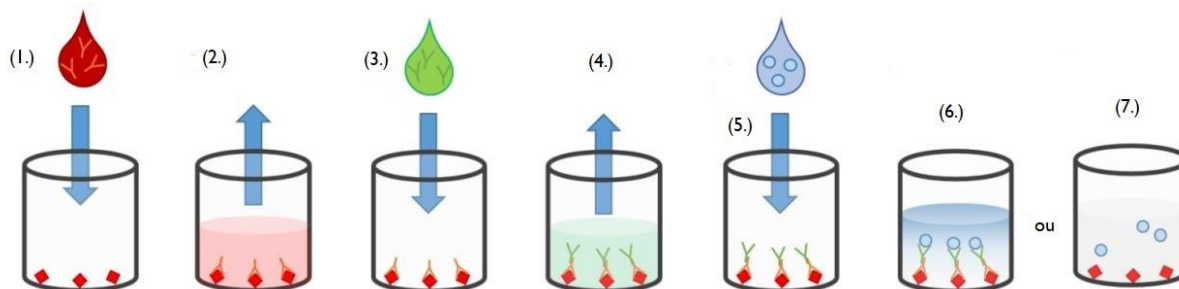
Uma amostragem incorreta ou nas fases iniciais da infeção, que se caracterizam por uma baixa concentração de vírus, podem originar um resultado falso-negativo.<sup>[26]</sup> Segundo estudos, o pico viral é atingido aquando o aparecimento dos sintomas, e a sua detecção deve ser feita entre os 5º e 21º dias de infeção.<sup>[1]</sup>



O teste de RT-PCR destaca-se essencialmente por ser bastante sensível (~95%) e específico (~100%).<sup>[3]</sup> Porém, a técnica de RT-PCR apresenta algumas limitações que complicam o seu acesso e uso, das quais, o seu elevado custo de concretização proveniente de instrumentos complexos, a necessidade de realização em ambiente laboratorial por profissionais especializado, o que aumenta o tempo de obtenção de resultados.<sup>[28]</sup>

## 6.2. Ensaio de imunoabsorção enzimática, ELISA

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) reconhece imunoglobulinas IgG e IgM resultantes da resposta imunitária do hospedeiro à infeção pelo vírus SARS-CoV-2.<sup>[1]</sup>



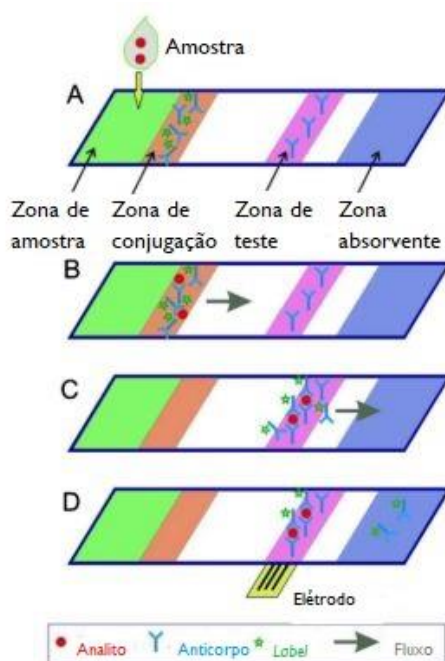
**Figura 4** - Sequência de ELISA. (Adaptado de [26])

Funciona através da introdução de uma amostra, de sangue ou soro, num dos 96 poços de uma placa de poliestireno, onde estão depositados antigénios específicos de SARS-CoV-2 (1.). Os anticorpos da amostra vão se ligar às proteínas adsorvidas no fundo do poço, e o resto da mistura vai ser rejeitada (2.). Posteriormente, são adicionados anticorpos secundários conjugados com uma enzima repórter, que se vão ligar aos anticorpos anteriormente imobilizados (3.). Após lavagem para remoção do excesso, acabam por ficar no poço apenas os anticorpos da amostra ligados à enzima (4.). A seguir, vai ser adicionado um composto incolor que vai interagir com o complexo anticorpo-enzima (5.), fazendo com que mude rapidamente de cor em caso de teste positivo, sendo possível observar esta alteração de cor através de análise espectrofotométrica (6.). Caso a amostra seja negativa, não vai haver mudança de cor (7.).<sup>[18,26]</sup>

Os testes ELISA são bastantes úteis na determinação de infeções passadas ou infeções duradoras, não sendo fiáveis para a deteção precoce da doença devido ao longo tempo de seroconversão. Esta tipologia de teste é bastante importante para o planeamento do controlo da doença, pela avaliação da proporção de população que já foi infetada.<sup>[26,29]</sup>

### 6.3. Teste de fluxo lateral, LFA

Dentro dos biossensores imunológicos, encontramos uma tipologia de elevada relevância, os testes ou imunoenaios de fluxo lateral (*lateral-flow assays*) (LFA). Ao longo dos tempos os LFA têm sido bastante utilizados na deteção de várias doenças infecciosas. Caracterizam-se por serem simples de produzir e manipular com um baixo custo de produção, necessitam de um reduzido volume de amostra, e demarcam-se por serem versáteis e portáteis. O seu mecanismo e constituição encontram-se esquematizados na Figura 5. A leitura dos resultados pode ser visível sem recurso a instrumentos óticos, graças ao aparecimento de cor num local definido.<sup>[1]</sup>



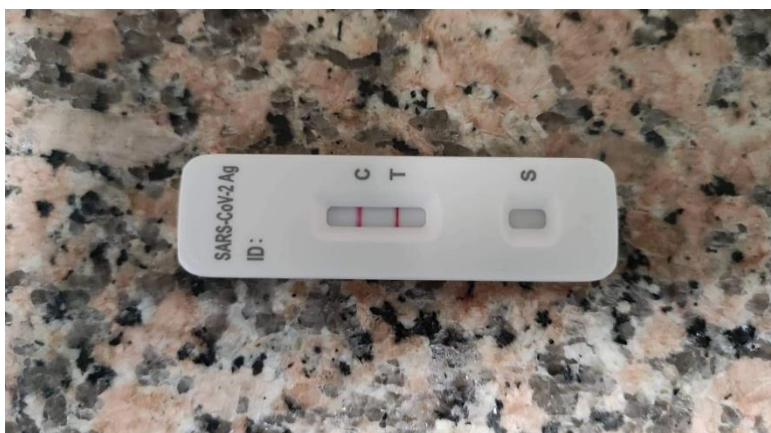
**Figura 5** – Constituição e mecanismo de LFA do tipo *sandwich*. (Adaptada de [1])

Os testes LFA funcionam maioritariamente com base na deteção de antígenos para a proteína S1 de SARS-CoV-2, através de uma técnica de imunocromatografia. São o método mais utilizado em POCT e os mais simples de realizar, dando resultados em poucos minutos, podendo ser executados em contexto de proximidade junto do doente.<sup>[1,9,30]</sup>

Para o combate mais rápido e eficaz da COVID-19, foram desenvolvidos testes LFA POC que foram distribuídos pelos espaços de saúde, ganhando denominação corrente de “testes rápidos de antígeno”. Estes funcionam através de uma cassette de teste que apresenta, um local de deposição da amostra (S) e uma zona de teste onde irão surgir duas linhas: uma linha de teste (T), onde os antígenos do vírus vão ser detetados; e uma linha de controlo (C), com uma conjugação de nanopartículas de ouro e anticorpos de SARS-CoV-2, como apresentado na Figura 6. A amostra recolhida do paciente, através de exsudados nasofaríngeos,

é colocada no local de amostra e as proteínas vão migrar ao longo da membrana por ação capilar. Chegando ao espaço da linha de teste, antígenos SARS-CoV-2 presentes na amostra interagem com anticorpos monoclonais anti-SARS-CoV-2 conjugados com partículas de cor, e aparece uma linha colorida a azul ou vermelho, caso haja a presença do vírus. Mesmo que a linha de esteja muito tênue ou uniforme, o resultado do teste deverá ser interpretado como positivo. Na zona da linha de controlo, o conjugado nanopartícula-anticorpo, formando um novo complexo com partículas de cor, e aparece a linha de controlo conferindo que o procedimento decorreu corretamente. Esta linha de controlo é utilizada para controlo procedimental, devendo aparecer sempre se o resultado do teste for válido, sendo que se este não for visível, o resultado do teste deve ser considerado como inválido.<sup>[14,18]</sup>

Estes apresentam uma sensibilidade entre os 84% e os 95%, e uma especificidade de aproximadamente 100%, com um tempo de teste de 15 minutos.<sup>[26,27,31]</sup>



**Figura 6** – Teste rápido de antígeno do tipo LFA.

#### 6.4. Características das técnicas RT-PCR, LFA, ELISA

**Tabela I** – Comparação entre os testes RT-PCR, POC LFA e ELISA. (Adaptada de [31])

Teste	Amostra	Analito alvo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	LOD (cópias/ $\mu$ L)	Tempo de teste médio (min)
RT-PCR	Exsudado nasofaríngeo, saliva	RNA	90 - 100	100	0.15 - 100	130
POC LFA	Exsudado nasofaríngeo	RNA	84 - 100	100	0,1 - 10	15
ELISA	Sangue	Anticorpos	86 - 100	89 - 100	-	120

**Tabela 2** – Resumo das vantagens e desvantagens dos teste RT-PCR, POC LFA e ELISA. (Adaptada de [27] e [31])

<b>Teste</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>RT-PCR</b>	Atual teste de referência; Alta sensibilidade e especificidade; Permite deteção de casos ativos; Útil na confirmação de casos.	Necessidade de reagentes e equipamento caro e especializado; Custo elevado; Necessidade de profissionais especializados para a sua realização.
<b>POC LFA</b>	Não necessita de conhecimento especializado por parte do operador; Fácil utilização; Rápido; Bom rácio custo-eficácia; Automático.	Dependente da boa realização da colheita da amostra; Leitura do resultado depende do operador.
<b>ELISA</b>	Útil para prognóstico e prevalência da doença; Necessário para identificação de dadores de plasma convalescentes.	Inadequado para identificação de casos ativos. Necessidade de profissionais especializados para a realização; Custo elevado; Mais suscetível a falsos positivos na presença de outros vírus.

## 7. Estratégias analíticas futuras

Os biossensores podem ter um papel crítico no controlo de pandemias, permitindo deteção rápida de casos suspeitos evitando cadeias de transmissão de doenças virais contagiosas. Por isso é necessário que estes apresentem propriedades críticas como, simplicidade, rapidez, boa relação custo-eficácia e portabilidade.<sup>[32]</sup>

Futuramente, o desenvolvimento de biossensores pode prender-se em características como, a portabilidade e a eliminação de equipamentos secundários, nomeadamente unidades de armazenamento e fontes externas de energia. Outro ponto crítico, é a quantificação dos dados analisados, podendo passar pela integração de tecnologia de aplicações de *smartphones*, permitindo avaliar com precisão as condições de saúde dos doentes aliado a um fácil acesso por parte dos mesmos e dos profissionais de saúde.<sup>[32]</sup>

Os biossensores tendem também a ser desenvolvidos para deteção de SARS-CoV-2 em amostras de saliva de forma a serem menos invasivos e proporcionarem uma maior facilidade na colheita, transporte e análise. Estudos recentes mostram a incorporação de um coletor de amostra de sangue num biossensor, por via de microagulhas indolores, sendo mais confortável para o doente.<sup>[32]</sup>

No combate à propagação de COVID-19, o desenvolvimento de novas metodologias e o aprimoramento das já utilizadas é de elevada importância para uma maior rapidez e efetividade de diagnóstico.<sup>[28]</sup> Para isso é necessário que os métodos de teste apresentem algumas melhorias no futuro entre, redução dos tempos de análise, adaptação à falta de condições ou equipamentos de algumas populações mais limitadas de recursos, e diminuição do manuseamento e tratamento direto do vírus, de forma a evitar a exposição do operador e diminuição dos casos de contaminação cruzada.<sup>[2]</sup>

Com a introdução de vacinas e o aparecimento de novas variantes, houve uma necessidade associada de haver um processo de revacinação mais frequente e regular sendo que para o controlo da sua efetividade, os métodos de análise de deteção de anticorpos, antígenos virais ou marcadores imunológicos podem vir a ser preponderantes na monitorização da resposta imunitária das populações.<sup>[2,28]</sup>

Outro dos grandes desafios associados à deteção de doenças virais é a capacidade de formação de profissionais especializados que sejam capazes de utilizar os diferentes biossensores e outras tecnologias bioanalíticas.<sup>[3]</sup>

## **8. Conclusões**

A deteção de doenças virais como a COVID-19 tem um papel fundamental para a saúde da comunidade global, sendo um fator preponderante nas proporções atingidas. A utilização de biossensores pode ser uma estratégia bastante viável graças à sua capacidade de simplificação de métodos associada a elevada sensibilidade e especificidade para o vírus. Com o estudo aprofundado de metodologias de deteção de SARS-CoV-2 melhora-se a forma e rapidez de deteção da doença, mas simultaneamente, constrói-se bases para futuros vírus que possam surgir no futuro, evitando tempos maiores de propagação incontrolada de doenças.

Quando olhamos para as estratégias analíticas de deteção com biossensores, verificamos o estudo e utilização vários alvos diferentes, cada um apresentando características favoráveis para o seu uso estabelecido em contexto laboratorial ou em maior proximidade com o doente, tendo em comum, uma boa sensibilidade e especificidade, rápido tempo de resposta do teste e uma consistência de resultados na deteção do vírus. Apesar das vantagens ainda existem pontos que necessitam de ser explorados e melhorados, como o custo de uso de alguns equipamentos, a necessidade de instrumentos de análise mais complexos e mão de obra especializada com conhecimentos aprofundados acerca das metodologias, para que os resultados sejam credíveis.

Para o futuro, avistam-se tempos mais controlados daqueles vividos logo após o surgimento do vírus SARS-CoV-2, mas provavelmente, a presença do vírus no nosso cotidiano será constante, e por isso é necessário uma constante procura de melhoria dos instrumentos atuais, quer para detecção dos vírus ativos, mas também no sentido de prevenção de um ressurgimento de eventos pandêmicos de grande escala que provocam enormes consequências globais.

## 9. Referências Bibliográficas

- [1.] BRAZACA, Laís Canniatti *et al.* - Biosensing strategies for the electrochemical detection of viruses and viral diseases – A review. **Analytica Chimica Acta.** . ISSN 18734324. 1159:2021). doi: 10.1016/j.aca.2021.338384.
- [2.] LE, X. Chris - Analytical Advances in Detecting SARS-CoV-2 and Further Research Needs for COVID-19 Testing. **Analytical Chemistry.** . ISSN 15206882. 93:24 (2021) 8379–8380. doi: 10.1021/acs.analchem.1c02327.
- [3.] BHALLA, Nikhil *et al.* - Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19. **ACS Nano.** . ISSN 1936086X. 14:7 (2020) 7783–7807. doi: 10.1021/acsnano.0c04421.
- [4.] TURNER, Anthony P. F. - Biosensors: Sense and sensibility. **Chemical Society Reviews.** . ISSN 14604744. 42:8 (2013) 3184–3196. doi: 10.1039/c3cs35528d.
- [5.] NARESH, Varnakavi; LEE, Nohyun - A review on biosensors and recent development of nanostructured materials-enabled biosensors. **Sensors (Switzerland).** . ISSN 14248220. 21:4 (2021) 1–35. doi: 10.3390/s21041109.
- [6.] CHADHA, Utkarsh *et al.* - Recent progress and growth in biosensors technology: A critical review. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry.** . ISSN 22345957. 109:2022) 21–51. doi: 10.1016/j.jiec.2022.02.010.
- [7.] ARAKAWA, Takahiro; DAO, Dzung Viet; MITSUBAYASHI, Kohji - Biosensors and Chemical Sensors for Healthcare Monitoring: A Review. **IEEJ Transactions on Electrical and Electronic Engineering.** . ISSN 19314981. 17:5 (2022) 626–636. doi: 10.1002/tee.23580.
- [8.] HUA, Yu *et al.* - DNA-Based Biosensors for the Biochemical Analysis: A Review. **Biosensors.** . ISSN 20796374. 12:3 (2022). doi: 10.3390/bios12030183.
- [9.] GIOVANNINI, Giorgia; HAICK, Hossam; GAROLI, Denis - Detecting COVID-19 from Breath: A Game Changer for a Big Challenge. **ACS Sensors.** . ISSN 23793694. 6:4 (2021) 1408–1417. doi: 10.1021/acssensors.1c00312.
- [10.] PELLETT, Philip E.; MITRA, Subhash; HOLLAND, Thomas C. - Basics of virology. **Handbook of Clinical Neurology.** . ISSN 00729752. 123:July 2014 (2014) 45–66. doi: 10.1016/B978-0-444-53488-0.00002-X.

- [11.] G/TSADIK, Daniel et al. – Basic Virology. **International Journal of Hypertension**. . ISSN 2252-634X. 1:1 (2020) 1–171.
- [12.] **World Health Organization: Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic** – [Consultado a 7 de julho de 2022]. Disponível em <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- [13.] HU, Ben et al. - Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nature Reviews Microbiology**. ISSN17401534.19:3 (2021)141–154. doi:10.1038/s41579-020-00459-7
- [14.] UDUGAMA, Buddhisha et al. - Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. **ACS nano**. ISSN1936086X. 14:4 (2020) 3822–3835. doi: 10.1021/acsnano.0c02624
- [15.] EISSA, Shimaa; ZOUROB, Mohammed - Development of a low-cost cotton-tipped electrochemical immunosensor for the detection of SARS-CoV-2. **Analytical Chemistry**. ISSN15206882. 93:3 (2021) 1826–1833. doi: 10.1021/acs.analchem.0c04719.
- [16.] GIAMBLANCO, Nicoletta et al. - Single-step label-free hepatitis B virus detection by a piezoelectric biosensor. **RSC Advances**. . ISSN 20462069. 5:48 (2015) 38152–38158. doi: 10.1039/c5ra03467a.
- [17.] DONMEZ, Soner; ARSLAN, Fatma; ARSLAN, Halit - A nucleic acid biosensor for detection of hepatitis c virus genotype 1a using poly(L-Glutamic acid)-modified electrode. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. . ISSN 15590291. 176:5 (2015) 1431–1444. doi: 10.1007/s12010-015-1655-6.
- [18.] DROBYSH, Maryia et al. - Biosensors for the Determination of SARS-CoV-2 Virus and Diagnosis of COVID-19 Infection. **International Journal of Molecular Sciences**. . ISSN 14220067. 23:2 (2022). doi: 10.3390/ijms23020666.
- [19.] ALAFEEF, Maha et al. - Rapid, Ultrasensitive, and Quantitative Detection of SARS-CoV-2 Using Antisense Oligonucleotides Directed Electrochemical Biosensor Chip. **ACS Nano**. . ISSN 1936086X. 14:12 (2020) 17028–17045. doi: 10.1021/acsnano.0c06392.
- [20.] YAKOH, Abdulhadee et al. - Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. **Biosensors and Bioelectronics**. . ISSN 18734235. 176:November 2020 (2021) 112912. doi: 10.1016/j.bios.2020.112912.



- [21.] ALI, Md Azahar et al. - Sensing of COVID-19 Antibodies in Seconds via Aerosol Jet Nanoprinted Reduced-Graphene-Oxide-Coated 3D Electrodes. **Advanced Materials**. . ISSN 15214095. 33:7 (2021). doi: 10.1002/adma.202006647.
- [22.] ELLEDGE, Susanna K. et al. - Engineering luminescent biosensors for point-of-care SARS-CoV-2 antibody detection. **Nature Biotechnology**. . ISSN 15461696. 39:8 (2021) 928–935. doi: 10.1038/s41587-021-00878-8.
- [23.] YOUSEFI, Hanie et al. - Detection of SARS-CoV-2 Viral Particles Using Direct, Reagent-Free Electrochemical Sensing. **Journal of the American Chemical Society**. . ISSN 15205126. 143:4 (2021) 1722–1727. doi: 10.1021/jacs.0c10810.
- [24.] LIOTTI, Flora Marzia et al. - Performance of a novel diagnostic assay for rapid SARS-CoV-2 antigen detection in nasopharynx samples. **Clinical Microbiology and Infection**. . ISSN 14690691. 27:3 (2021) 487–488. doi: 10.1016/j.cmi.2020.09.030.
- [25.] CHAN, Warren C. W. - Nano Research for COVID-19. **ACS Nano**. . ISSN 1936086X. 14:4 (2020) 3719–3720. doi: 10.1021/acsnano.0c02540.
- [26.] GREEN, Kile et al. - What tests could potentially be used for the screening , diagnosis and monitoring of COVID-19 and what are their advantages and disadvantages ? **The Centre for Evidence-Based Medicine develops, promotes and disseminates better evidence for healthcare**. 2020) 1–13.
- [27.] DHAR, Bidhan C. - **Diagnostic assay and technology advancement for detecting SARS-CoV-2 infections causing the COVID-19 pandemic**. [S.l.] : Springer Berlin Heidelberg, 2022 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00216-022-03918-7>>. ISBN 0123456789.
- [28.] HOSSEINI, Amin et al. - Roadmap to the Bioanalytical Testing of COVID-19: From Sample Collection to Disease Surveillance. **ACS Sensors**. . ISSN 23793694. 5:11 (2020) 3328–3345. doi: 10.1021/acssensors.0c01377.
- [29.] AQUINO, Adriano et al. - Updating the use of nano-biosensors as promising devices for the diagnosis of coronavirus family members: A systematic review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. . ISSN 1873264X. 211:July 2021 (2022) 114608. doi: 10.1016/j.jpba.2022.114608.
- [30.] ROCHE - **Roche’s COVID-19 antibody test receives FDA Emergency Use Authorization and is available in markets accepting the CE mark**. Disponível

em: <https://www.Roche.Com/Dam/Jcr:409Cf75C-a33a-48F8-8a48-C7D9a71Fcfab/En/03052020-Rochemediareleae-Elecsys-Covid19.Pdf>. 2020) 1–3.

- [31.] GIRI, Basant et al. - Review of analytical performance of COVID-19 detection methods. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. ISSN 16182650. 413:1 (2021) 35–48. doi: 10.1007/s00216-020-02889-x.
- [32.] RASMI, Yousef et al. - Emerging point-of-care biosensors for rapid diagnosis of COVID-19: current progress, challenges, and future prospects. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. ISSN 16182650. 413:16 (2021) 4137–4159. doi: 10.1007/s00216-021-03377-6.