



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Andreia Daniela Matos Aleixo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanobolhas: princípios, aplicações farmacêuticas e perspetivas futuras” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Tânia Luís, da Dra. Cláudia Mota e da Professora Doutora Carla Vitorino apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Andreia Daniela Matos Aleixo

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanobolhas: princípios, aplicações farmacêuticas e perspetivas futuras” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Tânia Luís, da Dra. Cláudia Mota e da Professora Doutora Carla Vitorino apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2021

Eu, Andreia Daniela Matos Aleixo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2016223688, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanobolhas: princípios, aplicações farmacêuticas e perspetivas futuras” 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, 6 de setembro de 2021.

Andreia Daniela Matos Aleixo

(Andreia Daniela Matos Aleixo)

AGRADECIMENTOS

No final desta etapa tão determinante, é com sincera gratidão que deixo um especial agradecimento:

A Deus porque Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas (Romanos 11:36).

Aos meus pais, não só pelo suporte e incentivo, mas pelo carinho e por cada abraço encorajador no final do dia. Ao “manito” pela cumplicidade e ternura inigualável.

Aos amigos, estudantes de Coimbra, pelo companheirismo diário, por me apoiarem e tornarem mais leve cada avassaladora época de exames. Joana, Carolina, Rute, Diana, Marina, Ana Miguel e Katia, a vocês, o meu maior e mais sincero FRA.

Às Serranas¹, pela forma afetuosa como me acolheram, pela paciência e compreensão e por serem exemplo do equilíbrio perfeito entre profissionalismo e amizade. Dra. Marina, Dra. Lúcia, Dra. Catarina, Tânia, Cátia e Mariana, sem vocês não teria sido uma experiência tão enriquecedora. Fica o agradecimento de quem convosco tanto aprendeu.

A toda a equipa dos Laboratórios Basi, nomeadamente à Dra. Stela, Dra. Cláudia Mota e Dra. Filipa por me terem proporcionado um estágio de excelência que tanto contribuiu para a minha aprendizagem. À Fabiana, Daniela, Patrícia, Cleide, João e Melanie pela forma atenciosa como me integraram, pela descontração e empenho em cada dia.

Aos docentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pela dedicação em prol da transmissão de conhecimento e evolução da ciência. Em especial à Professora Doutora Carla Vitorino pela disponibilidade, cuidado e atenção na orientação desta monografia. Aos não docentes, pela forma zelosa como me trataram e por terem alegrado a experiência universitária.

A Coimbra, a cidade que escreveu no meu coração “saudade” com tinta preta indelével. Serei estudante durante toda a vida.

¹ Nome carinhoso pelo qual são comumente conhecidos os elementos da equipa da Farmácia Serrano.

“Forc’d by reflective Reason, I confess, human science is uncertain guess”
- Do poema “Solomon on the vanity of the world” de Matthew Prior

ÍNDICE

CAPÍTULO I: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA FARMÁCIA SERRANO

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS.....	1
1. NOTA INTRODUTÓRIA.....	3
2. A FARMÁCIA SERRANO	3
3. ANÁLISE SWOT	4
3.1. Análise Interna	4
3.2. Análise Externa	9
4. ANÁLISE DE CASOS PRÁTICOS.....	13
4.1. Caso Prático 1	13
4.2. Caso Prático 2.....	14
4.3. Caso Prático 3.....	15
4.4. Caso Prático 4.....	15
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17

CAPÍTULO II: RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LABORATÓRIOS BASI

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS.....	18
1. NOTA INTRODUTÓRIA.....	20
2. OS LABORATÓRIOS BASI.....	20
3. ANÁLISE SWOT	21
3.1. Análise Interna	21
3.2. Análise Externa	24
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

CAPÍTULO III: MONOGRAFIA

NANOBOLHAS: PRINCÍPIOS, APLICAÇÕES FARMACÊUTICAS E PERSPETIVAS FUTURAS

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS.....	28
1. Resumo.....	30
2. Abstract.....	31
3. NOTA INTRODUTÓRIA.....	32
4. NANOBOLHAS.....	32
5. TERAPÊUTICA DIRECIONADA	33
6. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DAS NANOBOLHAS	34
6.1. Camada externa.....	35

6.2.	Núcleo gasoso.....	38
6.3.	Estratégias para administração de terapêutica	39
7.	MÉTODOS DE PRODUÇÃO	41
7.1.	Manipulação de microbolhas pré-formadas	41
7.2.	Formulação <i>ab initio</i> de sistemas em escala nanométrica	42
7.3.	Gerador de nanobolhas	46
8.	RELEVÂNCIA DOS ULTRASSONS.....	46
8.1.	Ultrassons.....	46
8.2.	Sonoporação.....	47
8.3.	Cavitação.....	48
9.	PROPRIEDADES DAS NANOBOLHAS	49
9.1.	Tamanho e uniformidade.....	49
9.2.	Estabilidade.....	49
10.	DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA A PREPARAÇÃO DE NANOBOLHAS.....	52
11.	APLICAÇÕES DAS NANOBOLHAS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA	54
11.1.	Administração de fármacos através da barreira hematoencefálica.....	54
11.2.	Administração de oxigénio.....	55
11.3.	Administração de fármacos antineoplásicos.....	57
11.4.	Terapia génica.....	59
11.5.	Teranóstica.....	61
12.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
13.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
	ANEXOS.....	74
1.	Certificado de formação da gama Lactacyd®	74
2.	Registo de presenças e sumários das formações assistidas enquanto estagiária na Farmácia Serrano.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Representação esquemática da estrutura e composição de uma nanobolha.	34
Figura 2:	Representação esquemática das diferentes estratégias para incorporação de agentes terapêuticos (i.e. fármacos e ácidos nucleicos) na estrutura da nanobolha.....	39

Capítulo I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária Farmácia Serrano

Sob orientação da Dra. Tânia Luís



LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

DGS	Direção Geral de Saúde
FEFO	<i>First Expired First Out</i>
FIFO	<i>First In First Out</i>
FS	Farmácia Serrano
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
MNSRM-EF	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia
RCM	Resumo das Características do Medicamento

I. NOTA INTRODUTÓRIA

A farmácia comunitária é a face mais visível da profissão farmacêutica. Segundo um estudo da Ordem dos Farmacêuticos realizado pelo Observatório da Empregabilidade no Setor Farmacêutico, em 2018, cerca de 40% dos farmacêuticos trabalhavam como farmacêuticos comunitários, sendo o setor com maior notoriedade. (Ordem dos Farmacêuticos, 2018) A realização do estágio curricular em farmácia comunitária enquanto unidade curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) proporciona o primeiro contacto com o contexto laboral real o que permite a aplicação prática e aprendizagem efetiva dos conceitos já previamente adquiridos. O estágio curricular, que suportou este relatório (organizado na forma de análise SWOT), decorreu de 11 de janeiro a 23 de abril de 2021 e foi realizado na Farmácia Serrano situada na Lousã, sob a orientação da Dra. Tânia Luís.

Por prestarem cuidados de proximidade as farmácias permitem o acesso ao medicamento e a equidade na prestação de cuidados de saúde de qualidade a todos os cidadãos e são, muitas vezes, o primeiro local a que os utentes recorrem em questões de saúde. Se por um lado o farmacêutico pode evitar deslocações desnecessárias a outros serviços de saúde, através da dispensa e aconselhamento sobre o uso correto de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica de Dispensa Exclusiva em Farmácia (MNSRM-EF), por outro lado tem um papel relevante na promoção da correta navegação do cidadão dentro do sistema de saúde, favorecendo o bom uso dos recursos disponíveis.

2. A FARMÁCIA SERRANO

Situada na vila da Lousã, a Farmácia Serrano (FS) é das mais antigas farmácias de Portugal. No final do século XIX, além de vários medicamentos, produziu diversos licores naturais medicinais, um dos quais - que viria a receber o nome de Licor Beirão - continua até hoje a ser produzido em terras lousanenses.

Centenária, a FS procura estar no mercado com uma postura inovadora, de total colaboração com os seus parceiros, colaboradores e utentes. Deste modo, para que fosse possível diversificar e melhorar os serviços oferecidos ao utente, mudou de instalações, localizando-se atualmente num edifício próprio totalmente dedicado à saúde e bem-estar.

Virada para o futuro, a FS iniciou o seu projeto *online*, que para além de permitir chegar a mais utentes, garante o serviço farmacêutico a quem não pode deslocar-se à farmácia. A farmácia complementa ainda os seus serviços à comunidade com a sua página em redes sociais, serviço pharmadrive, consultas de nutrição e ainda consultas farmacêuticas a doentes de risco.

A competência, honestidade e o profissionalismo são a base do trabalho farmacêutico na FS e o meio através do qual se tenta atingir o objetivo mais importante: promover o uso racional do medicamento contribuindo para a saúde, bem-estar e satisfação máxima do utente.

3. ANÁLISE SWOT

3.1. Análise Interna

3.1.1. Pontos Fortes/Forças

- **Ótima integração na equipa técnica**

Tive o privilégio de estagiar com uma equipa composta por colaboradores que primam pela competência, altamente qualificados, dinâmicos e com um elevado sentido de responsabilidade. A disponibilidade e prontidão no esclarecimento de dúvidas e partilha de conhecimento foram essenciais na colmatação de falhas inerentes à inexperiência. Além disso, o companheirismo sincero e a ajuda entre os elementos da equipa foram notáveis e contribuíram para um ambiente de trabalho agradável e uma experiência de estágio muitíssimo prazerosa e enriquecedora.

- **Adequação do MICF à realidade profissional**

Considero que o MICF oferece uma grande preparação científica e multidisciplinar, certamente suficiente para ingressar no mercado de trabalho e tão diversificada como as saídas profissionais. Com um corpo docente altamente diferenciado e qualificado, o programa das unidades curriculares versa conteúdos técnico-científicos muito atualizados. A grande proporção de aulas prático-laboratoriais e teórico-práticas munem os estudantes de ferramentas diferenciadoras que conferem vantagem competitiva face a outros profissionais. Unidades curriculares como Organização e Gestão Farmacêutica, Comunicação e Marketing Farmacêutico forneceram conhecimentos-base importantíssimos numa ótica comercial e financeira. Numa vertente terapêutica, unidades curriculares como Indicação Farmacêutica, Farmacoterapia ou Farmacologia I e II possibilitaram um aconselhamento individualizado e científico e farmacologicamente correto. Deontologia e Legislação Farmacêutica fez a ponte perfeita entre a componente económica da farmácia e a vertente ética que lhe está associada. Apesar do indicado supra, numa área em constante inovação, reconheço que a grande aprendizagem foi o gosto pela busca de conhecimento.

- **Gestão exímia**

A gestão de uma empresa não é apenas a contabilidade, verificação constante de índices e gráficos. É necessário integrar toda a equipa e dar a conhecer não só as capacidades e motivações, mas também os problemas e as fraquezas. Apenas uma equipa conhecedora da

realidade e constantemente informada pode unir-se num determinado fim. Na FS o diálogo entre a equipa de gestão e todos os colaboradores é franco, aberto e constante. São definidas metas e toda a equipa luta por um mesmo objetivo que monitoriza constantemente. Objetivos alcançados são motivo de partilha e festejo interno, e a base para novas metas. Foi uma experiência enriquecedora. Para mim, enquanto estagiária, sentir-me perfeitamente integrada na equipa e a lutar pelos mesmos objetivos foi motivador e engrandecedor.

- **Organização exemplar**

A organização é, no fundo, a base da sustentação logística de todas as atividades da empresa. A equipa técnica da FS é extremamente organizada e as tarefas individuais são bem definidas, conhecidas por todos e desempenhadas de modo a garantir que tudo fica feito no momento certo. A organização e ordenação dos produtos permite a otimização do processo de atendimento, facilitando a pesquisa e a identificação do produto ideal em cada aconselhamento. A organização dos produtos e os processos de atendimento otimizados permitem que, quer ao balcão, no *pharmadrive*² ou no serviço de entrega ao domicílio, o atendimento seja rápido, eficaz e eficiente.

- **Cordialidade e privacidade**

As boas práticas de farmácia comunitária ditam que o atendimento farmacêutico deve ser realizado com toda a atenção e cordialidade sempre assegurando a máxima comodidade e privacidade do utente. (Ordem dos Farmacêuticos, 2009)

Todos os indivíduos têm direito à sua privacidade e um assunto pode ser tabu para um utente, mas não causar qualquer constrangimento a outro. Assim, todo o *layout* de atendimento foi pensado por forma a dificultar que um utente se aperceba do assunto a ser tratado num outro atendimento, no mesmo espaço comercial e temporal. O utente pode, a qualquer momento, solicitar um atendimento num local privado. Observar e por em prática estas normas, tão enfatizadas durante o percurso académico, foi uma mais-valia. Na FS aprendi a estar atenta aos sinais do utente. Sempre que era necessário abordar uma patologia mais sensível, fazer um aconselhamento mais específico ou se existe dúvida sobre o à vontade do utente, este seria encaminhado para um atendimento no gabinete de apoio ao utente. De facto, cada ser humano é um individuo diferente e o atendimento, como pude verificar durante o estágio, deve ser tão personalizado e direcionado quanto possível.

² Serviço oferecido pela FS, para aumentar a comodidade dos utentes. Ideal para utentes com patologias menos graves que pretendem um atendimento rápido e para mães, evitando o constrangimento de retirar as crianças das cadeiras de transporte automóvel.

- **Sensibilização para o foco no utente**

O farmacêutico é, sem dúvida, um profissional de saúde altamente especializado no medicamento. Todavia, desde o primeiro dia fui sensibilizada para a importância do atendimento humanizado, de colocar o utente em primeiro lugar e utilizar o medicamento somente e na sua plenitude, como veículo para promoção da saúde do utente.

É necessário ter um compromisso com a prestação de cuidados de saúde, tentando proporcionar ao utente o melhor aconselhamento. (Ordem dos Farmacêuticos, 1998)

A FS tem uma percentagem considerável de utentes fidelizados, moradores das zonas residenciais próximas o que permite um acompanhamento mais completo, próximo e personalizado. Aprendi que, muitas vezes, mais que um medicamento ou aconselhamento farmacologicamente exímio, o utente procura um ombro amigo, um conselho ou alguma atenção, portanto, nem sempre o aconselhamento ideal é traduzido numa venda. Além disso, é importante manter a simpatia e postura mesmo quando as reações do outro lado do balcão são adversas. Estes ensinamentos, observados na prática nos profissionais que acompanhei, são a base da profissão e ajudaram de facto a moldar a minha postura ao balcão.

- **Plano de estágio adequado, organizado e flexível**

Durante o período de estágio tive oportunidade de desempenhar funções em diferentes áreas de atividade. O plano de estágio foi sendo estabelecido e ajustado em diálogo constante e franco, sempre com a preocupação de que a minha experiência de estágio fosse tão diversa quanto possível. A inexistência de um plano de estágio rígido mostrou-se vantajosa porque permitiu por um lado uma evolução gradual nas tarefas desempenhadas e por outro, um contacto ininterrupto, não seccionado, com as diferentes responsabilidades do farmacêutico. Inicialmente, o aprovisionamento e armazenamento dos produtos no local respetivo permitiu o contacto com algumas marcas comerciais tanto de MSRM como MNSRM, produtos de saúde e cosméticos. Serviu para interiorizar conceitos de gestão de stocks como *first expired first out*³ (FEFO) ou *first in first out*⁴ (FIFO), ou e para tomar conhecimento dos locais exatos dos produtos tornando, posteriormente, o processo de atendimento mais fluído. Tive oportunidade de aplicar os meus conhecimentos no gabinete do utente, no qual foram efetuadas medições de glicémia, pressão arterial e colesterol total. Contactei com a gestão do receituário e da faturação, subsistemas de saúde e organismos de participação. O ponto

³ Na FS o armazenamento obedece, normalmente, ao princípio FEFO que se traduz como “o primeiro a expirar o prazo de validade é o primeiro a sair”, em português. Desta forma, produtos com prazo de validade mais curto são dispostos nos locais de arrumação de modo a serem escoados em primeiro lugar.

⁴ Para produtos com prazo de validade semelhante, produtos apenas com período após abertura ou aos quais não está associado um prazo de validade, aplica-se método FIFO que se traduz como “o primeiro a entrar é o primeiro a sair”, em português. Assim, as primeiras existências a entrar em armazém são arrumadas de modo a que sejam também as primeiras a sair.

fulcral foi, claramente, a dispensa, indicação e aconselhamento de medicamentos e produtos de saúde.

- **Autonomia sem vulnerabilidade**

Os primeiros passos como colaboradora da farmácia são caracterizados por várias questões inerentes à inexperiência cujas respostas são essenciais para ganhar segurança e autonomia e representar a qualidade característica da FS. Senti o acompanhamento inicial necessário mas, progressivamente, foi-me também facultado e induzido o sentimento de verdadeira autonomia, apesar deste não ser em momento algum impedimento para todo o acompanhamento, e partilha de conhecimentos constante e necessária. Esta dinâmica de integração e trabalho na FS permitiu-me ganhar uma verdadeira autonomia, com segurança e confiança nas tarefas desempenhadas.

3.1.2. Pontos Fracos/Fraquezas

- **Fraca preparação para o aconselhamento**

Apesar da vasta e pertinente formação transmitida ao longo do MICEF, considero que existem algumas lacunas na preparação para o trabalho em farmácia comunitária. A preparação teórica é abrangente e aprofundada permitindo a fácil aplicação dos conhecimentos teóricos a situações práticas. Os casos-práticos simulados durante o percurso académico em unidades curriculares como Farmacoterapia, Indicação Farmacêutica ou Dermofarmácia e Cosmética, tiveram uma importância fulcral na mobilização do conhecimento. Todavia, a multiplicidade de situações com que o farmacêutico se depara em contexto de atendimento, faz com que dependa muito da experiência prática. A presença em contexto real permite aperfeiçoar a comunicação com o utente e auxilia na perceção das tenuidades que distinguem cada atendimento e que conduzem, muitas vezes, à escolha de opções terapêuticas distintas. Penso que seria vantajoso que, desde cedo, houvesse um maior contacto com esta realidade, nomeadamente através de simulação de atendimentos em aulas.

A localização não citadina da FS abre portas para o investimento no segmento dos produtos de veterinária e cuidado animal, um segmento de mercado em franco crescimento. Sabe-se que mais de metade dos agregados familiares portugueses possuem pelo menos um animal de estimação (André Rodrigues e Paulo Teixeira, 2020; Rita Porto, 2020) e que, em Junho de 2019, o mercado de veterinária (em farmácia comunitária) registou um crescimento de 24% em volume e 30% em valor face ao período homólogo do ano anterior. (IQVIA Portugal, 2020) Estes dados vêm demonstrar a notoriedade crescente dada não só aos animais de companhia,

mas também aos animais do campo explicando o crescimento generalizado deste segmento de mercado.

Considero que a unidade curricular Preparações de Uso Veterinário abrange os principais tópicos do grande espectro dos produtos de uso veterinário, mas é manifestamente insuficiente principalmente em locais mais rústicos. No entanto, é importante enfatizar que, em momento algum, a dificuldade no aconselhamento dos produtos de uso veterinário foi impeditiva para a prestação de um bom aconselhamento ao utente, porque foi colmatada pela prontidão na partilha de conhecimento por parte das colegas com mais experiência.

- **Curta duração e interrupção do aconselhamento do utente**

A indicação farmacêutica pressupõe a seleção, sob responsabilidade do farmacêutico, de um MNSRM, MNSRM-EF, produto de saúde e/ou indicação de medidas não farmacológicas com o objetivo de tratar um problema de saúde menor⁵. Além dos protocolos de dispensa dos MNSRM-EF ou das normas de boas práticas sobre indicação farmacêutica, a experiência em contexto real tem uma importância inegável. (Ordem dos Farmacêuticos, 2018)

O *feedback* dos utentes é o suporte real para aconselhamentos futuros. Ao ouvir a sua opinião sobre o aconselhamento prestado tomamos conhecimentos da efetividade do produto e de fatores simples como o sabor agradável ou desagradável de determinado xarope ou o aspeto pouco simpático de determinado produto. Estes fatores, aparentemente menores, facilitam a comunicação com o utente e podem conduzir a escolhas terapêuticas distintas numa próxima indicação. Em alguns casos, o farmacêutico pode também ser responsável por fazer a ponte entre o consumidor e o fabricante, comunicando à indústria farmacêutica o *feedback* dos utentes.

Verifiquei que, à parte dos utentes fidelizados, raramente as pessoas retornam à farmácia para dar o seu *feedback*, voltando apenas quando precisam novamente dos serviços que a farmácia oferece. Além disso, uma vez que o estágio tem naturalmente duração limitada, não foi possível acompanhar a evolução das patologias dos utentes. Destaco duas situações (Caso Prático 1 e Caso Prático 2) nas quais, apesar de ter segurança nas minhas palavras, nunca cheguei a saber o desfecho da situação.

⁵ Um problema de saúde menor é um problema de saúde não grave, autolimitado, de curta duração e que não apresente relação com manifestações clínicas de outros problemas de saúde do utente.

3.2. Análise Externa

3.2.1. Oportunidades

- **Atualização de conhecimentos e formação contínua**

O farmacêutico, como agente de saúde é responsável por contribuir e salvaguardar o uso responsável do medicamento, promovendo a saúde e o bem-estar.

Foi inspirador observar, por parte de toda a equipa da FS, o gosto e incentivo mútuo pela busca constante por conhecimento de forma a garantir que o aconselhamento prestado acrescenta valor aos utentes. Esta grande vontade de aprender levava a formações frequentes com consequentes discussões temáticas, o que se mostrou muito positivo porque tive oportunidade de aprender, rever e debater muitos conteúdos. Destaco a formação pela Sanofi® sobre alergias sazonais e o perigo do uso diário de vasoconstritores tópicos e a formação dedicada à gama Lactacyd® que veio colmatar algumas lacunas de conhecimento. Referir ainda a formação aBoca® onde foram apresentados produtos das diferentes linhas da marca.

Na FS todos os colaboradores dispõem e são encorajados a utilizar fontes de informação sobre medicamentos para rápido acesso durante o atendimento. Além dos Resumo das Características do Medicamento (RCM), disponíveis no *site* do INFARMED ou no sistema informático da farmácia, outras ferramentas complementares como os *sites* e-lactancia, drugs.com, ou calculadoras de doses de medicamentos, foram um excelente auxílio por permitirem uma resposta rápida a qualquer dúvida colocada pelo utente.

Fui desafiada a preparar uma formação, realizada para todos os colaboradores da FS, sobre uma marca de cosmética à minha escolha. Selecionei a ISDIN® com o objetivo fundamental de aumentar o conhecimento e capacidade de aconselhamento de produtos de cosmética e relembrar algumas propriedades de ingredientes cosméticos como a ureia ou aveia. No final, o *feedback* quanto ao trabalho desenvolvido e à capacidade de transmitir uma mensagem de forma perceptível foi muito motivador e recompensador.

- **Colaboração digital numa farmácia dinâmica e atual**

Num mundo cada vez mais virtual, a presença no digital é quase um pré-requisito para qualquer empresa. Também a FS sentiu necessidade de se modernizar, apostando cada vez mais no marketing digital quer para aumentar a divulgação quer para atrair novos clientes. A partilha de informações recorrendo ao *site* e redes sociais é uma constante, permitindo a criação de uma relação de proximidade e confiança com o utente. Neste sentido, periodicamente, são publicados artigos informativos com conselhos práticos e respostas a perguntas que surgem no contexto de atendimento ao balcão.

Enquanto estagiária tive a oportunidade colaborar com a FS através da criação de dois artigos informativos intitulados “O que é e como tratar o eczema e a pele atópica?” e “Alergias? Espirros, tosse, comichão nos olhos e no nariz?! Socorro!!”. Auxiliei também na realização de um vídeo explicativo, publicado nas redes sociais da FS, que versava no segmento de ortopedia e cuidados de saúde e abordava as diferenças, tamanhos e aplicabilidade das meias de compressão elásticas e meias de descanso.

- **Responsabilidade social e intervenção comunitária**

“A responsabilidade social das empresas é, essencialmente, um conceito segundo o qual as empresas decidem, numa base voluntária, contribuir para uma sociedade mais justa e para um ambiente mais limpo.” (Comissão das Comunidades Europeias, 2001)

Como agente de saúde e por forma a demonstrar a sua responsabilidade para com a sociedade, o farmacêutico tem o dever de atuar em ações que salvaguardem ambiente de vida humano, sadio e ecologicamente equilibrado. (Ordem dos Farmacêuticos, 1998) O cariz social da FS é notável. Durante o tempo de estágio tive oportunidade de presenciar e dinamizar atividades como “Elo Solidário” ou a campanha de recolha de fundos “Pedrinhas”, causas às quais a FS não é indiferente.

Durante o mês de março as Farmácias da Rede Elo-Farma, da qual a FS faz parte, aderiram ao projeto “Elo Solidário”. O intuito era a recolha, com a ajuda dos utentes, de bens de primeira necessidade para apoiar quem mais tem sofrido com a atual pandemia. Todos os bens foram encaminhados para associações locais que se encarregaram de as distribuir pelas suas comunidades. No caso da FS, os bens recolhidos foram entregues à Associação Vida Abundante, uma associação lousanense responsável pela distribuição semanal de roupa, calçado e géneros alimentícios a quem deles precisa.

A Pedrinhas é uma cooperativa de solidariedade social, sem fins lucrativos, que apoia crianças com doença oncológica ou deficiência igualmente grave, da região centro. Procura, a resolução de problemas habitacionais dos imóveis particulares onde residem, através de intervenções físicas nas habitações, melhoria da acessibilidade e conforto térmico, por exemplo. (Pedrinhas, 2021) Periodicamente, a FS associa-se a campanhas de angariação de fundos através da venda de produtos (i.e. postais, origamis ou chocolates) cujo valor reverte totalmente para a Pedrinhas.

- **Atividades de *team building* frequentes**

O foco do trabalho farmacêutico é, obviamente, contribuir para a saúde e bem-estar do utente, promovendo o uso racional do medicamento. Apesar disso, e porque os colaboradores passam grande parte do dia no seu local de trabalho, um ambiente agradável

tem uma importância fulcral. Atividades de *team building*⁶ mantêm os profissionais motivados, mais comprometidos uns com os outros e com o utente, aumentam a produtividade e são fundamentais para a criação de confiança mútua e de um ambiente de trabalho prazeroso.

Além disso, a profissão farmacêutica é caracterizada por longos períodos ortostáticos, levantamento de pesos (encomendas) e alguma tensão e *stress* em períodos de maior afluência. Assim, foi promovida uma vídeo-aula com um *personal trainer* focada na correção postural e prevenção de lesões, na qual tive oportunidade de participar.

- **Estágio de verão**

A oportunidade de realização de estágios de verão concedida pela faculdade é uma mais-valia inquestionável para qualquer estudante porque proporciona o primeiro contacto com o contexto laboral real, o que se traduz numa aprendizagem prática e efetiva, deixando o estagiário mais preparado para um contacto futuro.

O estágio extracurricular de verão realizado em julho de 2019 possibilitou o primeiro contacto com o espaço e com a equipa técnica da FS, minimizou o constrangimento inicial e facilitou bastante a minha integração. Além disso pude ver a evolução e exequibilidade de iniciativas que tinham sido efetivadas aquando o meu estágio de verão. Em julho de 2019 o “Sistema Semáforo”⁷ estava nos seus inícios de implementação e foi muito interessante constatar que, 18 meses depois, já era conhecido e procurado pelos utentes, estando completamente bem implementado na farmácia.

- **Preparação de medicamentos manipulados**

O medicamento manipulado surge como forma de resposta a necessidades específicas de doentes individuais para os quais não existe uma resposta adequada da indústria. O Decreto-Lei 95/2004 estabelece que o farmacêutico tem a responsabilidade de garantir a qualidade e a segurança das preparações farmacêuticas manipuladas não só no que diz respeito à dose de substância ativa, como também, da possibilidade de interações que comprometam a ação ou a segurança do medicamento.

⁶ *Team building* traduz-se como “consolidação da equipa” e diz respeito a uma serie de atividades com o objetivo de fortalecer as relações interpessoais entre indivíduos de um mesmo grupo. Renova a motivação dos colaboradores e aumenta o espírito de equipa e de entajuda elevando a produtividade. (Cambridge Dictionary, 2014)

⁷ Além do custo monetário associado ao *terminus* do prazo de validade dos medicamentos e produtos de saúde, existe também um desperdício de recursos. O “Sistema Semáforo” tenta ser objeto de benefício mútuo quer para a farmácia quer para o utente. Desta forma, produtos de saúde e cosméticos cujo prazo de validade estava a chegar ao fim eram assinalados com círculos de diferentes cores (vermelho, amarelo ou verde) consoante o menor ou maior tempo restante do prazo de validade. A cada uma das cores era associada uma percentagem de desconto o que permitia por um lado, diminuir o custo da farmácia devido ao não escoamento do *stock* e por outro, aumentar a acessibilidade do utente a produtos de saúde e cosmética. É muito importante enfatizar que um produto só era elegível para este sistema, enquanto fosse possível o uso total do produto antes do prazo de validade expirar.

Durante o estágio tive oportunidade de acompanhar de modo participativo todo o circuito do medicamento manipulado, desde a aquisição de matérias-primas e materiais de embalagem, validação da prescrição (no caso de formulações magistrais), preparação do medicamento manipulado, procedimentos de registo e preenchimento de documentação própria até à dispensa informada do medicamento. Foi-me possível a manipulação de vários medicamentos, sempre com supervisão e orientação da farmacêutica responsável: pomada de enxofre a 6% (prescrição pediátrica com indicação para a sarna), pomada de Dermovate® e vaselina salicilada, (prescrição pediátrica com indicação para a sarna), solução alcoólica de ácido bórico à saturação (solução antisséptica para aplicação auricular), pomada de vaselina salicilada com ureia (indicada para tratamento de lesões queratínicas).

3.2.2. Ameaças

- **Conjetura atual**

Num período em que a economia mundial se encontrava em desaceleração, a pandemia provocada pelo vírus SARS-Cov-2 veio contribuir grandemente para o agravamento das previsões económicas. (Ordem dos Economistas, 2020)

Na fase de crescimento pandémico exponencial, as medidas extraordinárias propostas pelo plano de contingência vieram assegurar condições de segurança e saúde aos colaboradores das farmácias, mas tiveram, como era expectável, algumas repercussões. Na FS, de modo a mitigar o risco de contágio, o serviço de determinação de parâmetros bio-analíticos deixou de ser realizado no período entre março e maio de 2020. Durante o período de estágio curricular estágio já se realizavam estas determinações, respeitando todas as normas de segurança recomendadas pela Direção Geral de Saúde (DGS). Notei, no entanto, uma diminuição acentuada do número de determinações face ao que presenciei durante o estágio de verão em julho de 2019, num período pré-pandemia. O dever de confinamento impôs a alteração da rotina de alguns utentes que acabaram por “perder o hábito” de se deslocar à farmácia para monitorizar os seus níveis de glicémia ou pressão arterial. Receio que a menor monitorização destes parâmetros se reflita num desconhecimento sobre a efetividade da medicação tomada e, portanto, num agravamento a curto/longo-prazo da situação patológica dos utentes.

- **Alterações na entidade reguladora**

O regime de comparticipação tem como função aumentar a acessibilidade ao medicamento, diminuindo o custo para o utente. Em Portugal consiste num regime de copagamento no qual

o utente paga uma percentagem de cada medicamento prescrito, sem fomentar a utilização excessiva que a gratuitidade do medicamento geraria.

As alterações na percentagem de comparticipação e no preço dos medicamentos são constantes e, se algumas vezes são quase insignificantes, noutras são demasiado acentuadas. O surgimento de um medicamento genérico é acompanhado pela diminuição da comparticipação do medicamento de marca, o que provoca um aumento no preço (para o utente) de um medicamento de marca e gera desconfiança. Esta situação é exacerbada pela indicação (muitas vezes desatualizada) na prescrição sobre os encargos do utente. A falta de confiança causa entropia e descentraliza o atendimento, dificulta o diálogo e coloca entraves na interação com o utente, o que é profundamente nefasto.

Outro exemplo da desconfiança gerada pelas alterações na entidade reguladora é abordado no capítulo seguinte, Caso Prático 3.

4. ANÁLISE DE CASOS PRÁTICOS

4.1. Caso Prático I

A utente B. veio a farmácia em busca da solução para o problema de pele do filho de 8 anos (não presente na farmácia). Refere que o filho nunca tinha tido nenhuma patologia dermatológica mas recentemente tinham surgido manchas vermelhas e descamativas na zona dos joelhos e cotovelos. Lesões de tal modo graves que implicaram uma visita ao médico que recomendou a aplicação de “alguma hidrocortisona”. Aconselhei a aplicação de Pandermil[®] (MNSRM, hidrocortisona 10mg/g), duas a três vezes por dia na zona das lesões, durante um período de 3 a 4 dias, seguida da aplicação de Pandermil[®] misturado com creme hidratante. Quando referi a importância da hidratação cutânea para que a função barreira da pele fosse eficiente, a utente B. questionou se existia alguma pomada que pudesse aplicar de modo contínuo ou nos primeiros sinais de vermelhidão de modo a evitar a exacerbação da situação e minimizar o desconforto.

Em conversa com a utente, tentamos chegar à melhor opção hidratante para aquela criança. Em conjunto, escolhemos a opção LipikarBaumeAP+[®] que tem na sua composição niacinamida para acabar com o ciclo vicioso da comichão. Para limpeza aconselhei um creme lavante relipidante, anti-irritação e anti-prurido, de modo a reduzir a secura cutânea excessiva e a sensação de repuxar. Aconselhei a preferir os duches em detrimento dos banhos de imersão, a usar água não muito quente e a evitar a fricção da toalha preferindo secar com pancadinhas leves.

4.2. Caso Prático 2

Após consulta com o pediatra, a Sra P. dirige-se à farmácia com prescrição de Pantelmin[®] em suspensão oral (MNSRM, mebendazol 20mg/mL), com a posologia de 2,5mL de 12/12h durante 3 dias. Referiu que, já à saída do consultório, o médico aconselhou a desparasitação de toda a família e dos animais de estimação, mas que não sabia como proceder por ainda estar a amamentar. Inquiri sobre a composição do respetivo agregado familiar: quantos adultos, quantas crianças e quais as suas idades, quais os animais de estimação e respetivo peso.

Para os animais de estimação aconselhei Drontal[®] comprimidos para cães e Drontal[®] comprimidos para gatos, em doses adequadas ao peso dos animais. Para o marido recomendei a toma de 1 comprimido de Pantelmin[®], de 12/12h durante 3 dias.

Seguidamente, de modo a verificar a possibilidade da toma de Pantelmin[®] durante a amamentação, consultei o RCM do medicamento em questão. O RCM refere que não se conhece se o mebendazol é excretado no leite materno do ser humano e que o mebendazol é absorvido numa pequena extensão e que tem elevada percentagem de ligação às proteínas plasmáticas. (RCM Pantelmin, 2016) Pela elevada percentagem de ligação às proteínas plasmáticas pode inferir-se que a passagem para o leite materno não acontece em quantidades significativas. No entanto, para reforçar a segurança no aconselhamento recorri cumulativamente à ferramenta e-lactancia, que veio confirmar a minha linha de pensamento. A baixa biodisponibilidade oral (<10%) implica uma concentração plasmática nula ou mínima de fármaco no lactente amamentado por mães tratadas, exceto em prematuros e recém-nascidos, nos quais pode existir maior absorção intestinal. Além disso, o mebendazol pertence à lista de medicamentos essenciais da OMS 2002 e é compatível com a amamentação. (e-lactancia Mebendazol, 2021)

Com base nesta informação, recomendei a toma de Pantelmin[®], apesar de estar a amamentar. Expliquei como proceder para que a toma do medicamento fosse desfasada da hora da mamada e assim, o risco associado ao medicamento fosse minimizado.

Por exigir a toma de 6 comprimidos totalizando um período de tratamento de 3 dias, a mãe preferiu não tomar desparasitante. Mesmo enfatizando a relevância da toma conjunta de desparasitantes por todos os elementos do agregado familiar e animais de estimação, a utente preferiu levar apenas o desparasitante para o filho, o marido e os animais de estimação. De notar que, apesar do aconselhamento farmacêutico, a decisão final é sempre do utente e deve ser respeitada.

4.3. Caso Prático 3

Uma utente imigrante, com residência em Portugal há pouco tempo e aparentemente na casa dos 50 anos, dirigiu-se à farmácia pedindo especificamente Telfast® 180 (180mg de cloridrato de fexofenadina) por ser o anti-histamínico que tomava habitualmente. Perguntei quais os sintomas que mais a incomodavam e qual a sua duração mas, como Telfast® 180 era um MSRM, não pude aceder ao seu pedido. Aconselhei uma alternativa terapêutica que achei adequada. Como a utente se mostrou inflexível quanto à toma de um medicamento alternativo, aconselhei a procurar um médico para que avaliasse a situação. Este cenário sucedeu-se duas vezes.

Ainda durante o meu período de estágio, em meados de abril, ocorreu a alteração da classificação do medicamento Telfast® 180 (180mg de cloridrato de fexofenadina) que passou a ser classificado como MNSRM. Se, por um lado é ótimo por ser mais um medicamento que o farmacêutico tem à disposição no aconselhamento, por outro lado explicar a esta utente o porquê de já lhe poder ceder o medicamento, mesmo sem apresentação de prescrição médica, mostrou-se muito difícil.

4.4. Caso Prático 4

Um utente que aparentava ter na casa dos 60 anos, do sexo masculino, dirige-se à farmácia, através do serviço pharmadrive para comprar Actifed® e umas pastilhas para a dor de garganta (menciona ter preferência por Strepfen®, ou por “aquela mebocaina com anti-inflamatório”, referindo-se à Mebocaina® Anti-Inflam).

Antes de aconselhar qualquer medicamento, questiono quanto aos sintomas que mais o incomodam, qual a frequência e duração dos mesmos. Refere ausência de febre, cansaço e dores no corpo, garganta irritada sem dor ao engolir e corrimento nasal há dois dias. Inquiri ainda sobre a presença de outras patologias, ao que indicou ter hipertensão arterial ultimamente controlada.

Expliquei que o medicamento que referiu (Actifed®) tem na sua composição cloridrato de pseudoefedrina (vasoconstritor oral), e triprolidina (anti-histamínico H1). A pseudoefedrina atua como descongestionante nasal porque, pelo seu efeito vasoconstritor, quando administrado por via sistémica, diminui o edema da mucosa nasal. A vasoconstrição e os efeitos simpaticomimético da pseudiefedrina podem contribuir para um aumento da pressão arterial, tornando insegura a toma deste medicamento por este utente. A triprolidina é um anti-histamínico H1 potente de primeira geração, e inibe competitiva e reversivelmente a histamina por ligação ao recetor H1. É também um inibidor competitivo da acetilcolina na ligação aos

recetores muscarínicos pelo que a toma por pacientes hipertensos não é recomendada. (*Protocolo de Dispensa Exclusiva em Farmácia*, 2017)

Por todas as razões supracitadas e por ser preferível iniciar um tratamento pela toma de monofármacos, aconselhei a toma de paracetamol 500mg de 8/8h para reduzir as dores e o desconforto e, como não apresentava dor ao engolir, recomendei a toma de Mebocaina® (sem anti-inflamatório) também de 8/8h. Aconselhei ainda a que, durante 2 a 3 dias, fosse feita lavagem nasal com água do mar hipertónica, para ajudar a diminuir as secreções nasais.

Alertei o utente que, caso os sintomas não melhorassem ou se surgissem novos sintomas após 5 dias de tratamento deveria consultar um médico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tempo de estágio na Farmácia Serrano foi um período de intensa aprendizagem e crescimento pessoal e profissional, pelo que o balanço é extremamente positivo, como se observa pela prevalência de pontos fortes.

Verificar, na prática, o impacto do aconselhamento e indicação farmacêutica na prevenção da doença, e a melhoria da qualidade de vida dos utentes associada à passagem de informação crítica para o uso racional do medicamento fez-me tomar consciência do real o impacto do farmacêutico como especialista do medicamento, e promotor de saúde e bem-estar.

Este estágio evidenciou a posição privilegiada que o farmacêutico ocupa. A proximidade ao utente permite contribuir ativamente para que os utentes retirem o maior benefício terapêutico dos seus tratamentos pelo uso de medicamentos. Vi que, fruto do trabalho incansável de gerações anteriores, os utentes recorrem cada vez mais à farmácia para tratar problemas de saúde menores e que a confiança depositada no farmacêutico é notória o que se mostra muito desafiador e gratificante.

A excelência do exercício profissional farmacêutico está associada ao empenho, interesse e acompanhamento permanente dos desenvolvimentos técnico-científicos para que seja possível oferecer uma intervenção farmacêutica de valor, cada vez mais centrada no utente e cuidados de saúde cada vez mais diferenciados. Os maiores ensinamentos foram, sem dúvida, a empatia, atualização permanente e a não estagnação intelectual.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRÉ RODRIGUES; PAULO TEIXEIRA - **O fenómeno dos animais de estimação em números – Renascença**. [Consult. 29 jun. 2021]. Disponível em: <https://rr.sapo.pt/artigo/o-mundo-em-tres-dimensoes/2020/02/06/o-fenomeno-dos-animais-de-estimacao-em-numeros/181036/>

CAMBRIDGE DICTIONARY - Team building - Definition. . ISSN 19357001. 103:4 (2014) 68–70.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - **LIVRO VERDE: Promover um quadro europeu para a responsabilidade social das empresas**.

ORDEM DOS ECONOMISTAS - **Recessão em 2020: Uma crise inesperada** [Consult. 22 ago. 2021]. <https://www.publico.pt/2020/03/30/economia/opiniao/recessao-2020-crise-inesperada-1909799>

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. 1998) 1–9.

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária (BPF). **Conselho Nacional da Qualidade**. 3ªEdição:2009).

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Estudo da empregabilidade: do ensino à profissão farmacêutica** [Consult. 24 abr. 2021]. Disponível em: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/editor2/Newsletter/Documentos/Apresentacao_Estudo_Empregabilidade_2018_12_Fev_2019_2.pdf

ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Norma específica sobre indicação farmacêutica. **Ordem dos Farmacêuticos**. 2018) 1–6.

IQVIA PORTUGAL - Evolução Mensal do Mercado Farmacêutico em Farmácia. 2020).

Mebendazole and breastfeeding - [Consult. 21 mar. 2021]. Disponível em <http://www.e-lactancia.org/breastfeeding/mebendazole/product/>

Pedrinhas - [Consult. 29 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.pedrinhas.org/sobre/Nos#about>

RITA PORTO - **Há mais de 2,6 milhões de animais de estimação registados em Portugal – Observador** [Consult. 29 jun. 2021]. Disponível em: <https://observador.pt/2020/10/24/ha-mais-de-26-milhoes-de-animais-de-estimacao-registados-em-portugal/>

Capítulo II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica Laboratórios Basi

Sob orientação da Dra. Cláudia Mota



LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

GMP	Boas Práticas de Fabrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
LCQ	Laboratório de Controlo de Qualidade
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
SST	Teste de Adequabilidade do Sistema

I. NOTA INTRODUTÓRIA

O farmacêutico é um profissional polivalente e altamente qualificado, capaz de desempenhar funções em todas as fases do circuito do medicamento. Quer numa vertente económica e comercial de desenvolvimento do negócio quer numa vertente mais científica o farmacêutico ocupa, na indústria farmacêutica, posições de gestão de projetos, desenvolvimento de produto (desenvolvimento analítico e de formulação) passando pelo controlo e garantia da qualidade sem esquecer os assuntos regulamentares.

O empenho no desenvolvimento de métodos cada vez mais robustos de controlo de qualidade possibilita a obtenção de um produto acabado progressivamente mais credível, com qualidade, segurança e eficácia aceitáveis. O controlo de qualidade é primordial na conquista da confiança, solidez e credibilidade por profissionais de saúde e consumidores.

O estágio que serviu de base a este relatório ocorreu no período de 3 de maio a 30 de julho de 2021, sob a orientação da Dra. Cláudia Mota. Foi inserido no laboratório de controlo de qualidade (LCQ), no departamento responsável pela realização de estudos de estabilidade.

Este relatório de estágio pretende ser um espelho da minha experiência enquanto estagiária nos Laboratórios Basi. Está estruturado na forma de análise SWOT e tenta fazer uma avaliação retrospectiva e uma reflexão crítica da adaptação ao ambiente profissional e da aplicabilidade dos conhecimentos adquiridos ao longo do plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na indústria farmacêutica.

2. OS LABORATÓRIOS BASI

Os Laboratórios Basi são parte integrante do Grupo FHC | Farmacêutica que desenvolve atividade de comercialização, registo e licenciamento no mercado internacional, estando presente em 64 países e 4 continentes. O Grupo FHC | Farmacêutica é constituído, no momento, por 8 empresas que operam tanto a nível da produção de medicamentos e produtos de saúde (Laboratórios Basi), distribuição, logística e promoção, (Laphysan, Empifarma, Overpharma e FHC) como a nível da consultoria e tecnologias de informação (Phagecon, Actradia e Zeone).

Duas unidades de produção industrial dos Laboratórios Basi são localizadas em Mortágua e permitem a produção de formas farmacêuticas líquidas, semissólidas e injetáveis. Os Laboratórios Basi produzem injetáveis de pequeno e grande volume, géis, cremes e pomadas, xaropes, soluções e suspensões orais, soluções cutâneas e enemas, apresentando um portfólio com mais de 240 produtos farmacêuticos registados. Apresentam medicamentos, dispositivos médicos, suplementos alimentares e dermocosméticos como soluções em 17 diferentes áreas terapêuticas e são uma referência inquestionável no setor.

3. ANÁLISE SWOT

3.1. Análise Interna

3.1.1. Pontos Fortes

- **Formação inicial e formação contínua**

De acordo com a política interna dos Laboratórios BASI, todos os colaboradores têm um plano de formações que devem cumprir. Este plano contempla várias formações iniciais e uma visita a todas as instalações da empresa. Proporciona a formação contínua tanto para os colaboradores mais recentes como para os mais antigos, incentivando assim a atualização constante de conhecimentos.

No primeiro dia, presenciei diversas formações focadas na área das boas práticas de fabrico (em inglês, *Good Manufacturer Practices*, GMP), farmacovigilância e higiene e segurança no trabalho.

Devido aos perigos inerentes ao trabalho em laboratório e antes de iniciar uma vertente mais prática do estágio foi-me aconselhada a leitura atenta de alguns procedimentos técnicos operacionais sobre o *modus operandi* em caso de derrames de substâncias ácidas ou básicas, calibração e verificação de equipamentos (potenciómetro e balanças), registo de operações em *logbooks*⁸ e caderno de laboratório. Como o meu estágio estava alocado ao departamento de estudos de estabilidade, foi-me ainda apresentada documentação explicativa dos diferentes tipos de estudos de estabilidade, condições de armazenamento e ensaios realizados em cada tempo.

O conhecimento adquirido nestas formações facilitou o processo de compreensão e adaptação à estrutura organizacional dos Laboratórios Basi. Estas formações funcionaram ainda como suporte teórico para a execução das atividades que me foram propostas durante o período de estágio. Apesar de muitos dos conteúdos terem sido já alvo de estudo durante o plano curricular do MICF, vê-los aplicados à realidade industrial foi muito revigorante e proveitoso.

- **Excelente ambiente de trabalho**

Apesar do meu estágio curricular ser inserido no LCQ, no departamento responsável pelos estudos de estabilidade, e porque todos os elementos do laboratório trabalham para um objetivo comum, fui contactando com colaboradores de diferentes áreas. Tive imenso prazer

⁸ Nos Laboratórios Basi cada colaborador é detentor de um caderno de laboratório no qual é responsável por registar, passo-a-passo, a execução laboratorial das suas tarefas. Para melhor rastreabilidade das amostras e dos procedimentos existe também um *logbook* associado a cada equipamento. Um *logbook* é um livro de registos de laboratório, no qual são registadas as utilizações de cada equipamento de modo a entender exatamente a amostra analisada, a data de análise e o analista responsável.

em trabalhar com cada um. Todos eles, tanto analistas como pessoal de higienização, me receberam de modo afável, preocupados com a minha integração e bem-estar fomentando um ambiente de trabalho agradável.

- **Adequação do MICF à realidade profissional**

O plano curricular do MICF oferece preparação técnica, científica e laboratorial diversificada que possibilita o desenvolvimento de capacidades diferenciadoras conferentes de vantagem competitiva face a outros profissionais.

A formação laboratorial de excelência proporcionada pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra possibilitou, desde cedo, a fácil comunicação com analistas mais experientes. Unidades curriculares como Métodos Instrumentais de Análise, Química Analítica ou Tecnologia Farmacêutica, foram fundamentais para o fornecimento de conhecimentos basilares importantíssimos num laboratório analítico de indústria farmacêutica.

Vivenciar, na primeira pessoa, a realidade profissional da indústria permitiu a consolidação dos conhecimentos teóricos pré-existentes sendo o estágio quase um *scale up* de uma aula-laboratorial. Verifiquei a aplicabilidade e o encadeamento lógico das unidades curriculares à medida que tive oportunidade de refazer atividades laboratoriais que tinham sido objeto de estudo durante o plano curricular do MICF.

- **Formação académica diversificada e equipa multidisciplinar**

O LCQ é constituído por uma equipa multidisciplinar que se complementa e completa, constituída por colaboradores com formação superior diferenciadora e especializada.

A complementaridade de conhecimentos em diversos domínios do saber é uma realidade bem visível e permite agrupar energias de forma a tornar o todo maior que a soma das partes, referindo-me claro ao conhecimento de cada colaborador e sua aplicabilidade.

Uma equipa multidisciplinar facilita a troca de informação e melhora o desempenho. Quando um desafio é enfrentado por colaboradores com diferente *know-how* torna-se mais fácil resolvê-lo.

Por ser conhecida a minha formação académica, muitas vezes fui questionada sobre o mecanismo de ação, modo de administração ou possíveis efeitos secundários de um determinado medicamento, algo que compartilhava com orgulho farmacêutico. Enquanto isso, os analistas mais experientes enfatizavam pequenos pormenores, muitas vezes não explícitos no protocolo analítico, importantes para melhorar a qualidade de determinada análise, existindo uma troca de saberes interessante e enriquecedora.

- **Autonomia gradual na execução de tarefas**

O primeiro contacto com a realidade profissional é quase sempre caracterizado por um período de incerteza como consequência da pouca experiência.

Se, por um lado, a disponibilidade e prontidão no esclarecimento de dúvidas incentivaram a minha autonomia e análise crítica, por outro a partilha de conhecimentos e experiências foi constante e essencial para interiorizar procedimentos de funcionamento do laboratório.

As exigências de qualidade adotadas pela empresa ditam que todas as análises devem ser realizadas por analistas qualificados, havendo um processo de qualificação gradual interno. Por este motivo, e porque na qualidade não podem existir facilitismos, a execução de algumas tarefas de forma totalmente autónoma não era permitida. Ainda assim, senti que me foi dada toda a autonomia possível. As tarefas propostas eram realizadas com a supervisão de analistas mais experientes e sempre que possível, eram sugeridas oportunidades de melhoria. A garantia de que os resultados obtidos eram confiáveis revelou que, efetivamente, o trabalho por mim desenvolvido constituía um contributo para a empresa.

A multiplicidade de tarefas realizadas permitiu-me participar diretamente nas atividades rotineiras da organização, e a autonomia que me foi concedida estimulou consideravelmente a minha proatividade e espírito de iniciativa, contribuindo em muito para o meu desenvolvimento profissional.

- **Integração e sensação de pertença**

Toda a experiência e conhecimento técnico-científico dos colaboradores poderia ser um entrave à aproximação de uma estagiária. Não foi o que senti. A minha vontade de aprender e o espírito crítico sempre foram correspondidas e apoiadas. A forma simples, mas não simplista como foram respondidas todas as minhas questões e a informalidade de linguagem surpreenderam-me positivamente desde o primeiro momento.

A cordialidade dos analistas mais experientes aproxima os novos colaboradores tornando simples, agradável e intuitiva a integração nesta equipa de trabalho. A equipa é de tal forma coesa que a sensação de pertença se torna inevitável.

A vontade de pertencer, de facto, à equipa aumenta com o passar dos dias. No meu caso concretizou-se. Hoje posso também dizer orgulhosamente que pertenço à equipa do LCQ dos Laboratórios Basi.

3.1.2. Pontos Fracos

- **Conhecimentos práticos de HPLC limitados**

O departamento responsável pelos estudos de estabilidade está subdividido em duas secções: numa são realizadas análises de química clássica noutra são realizadas análises de identificação e doseamento por cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC⁹).

Tive oportunidade de estagiar em ambas as secções sendo muito superior o período de estágio na secção das análises de identificação e doseamento do princípio ativo, produtos de degradação e conservantes por HPLC.

Apesar da excelente formação laboratorial acima explanada, deparei-me com algumas dificuldades no manuseamento do HPLC. Bem sei que o MICF procura fornecer os conhecimentos base em diferentes vertentes e dotar os seus estudantes de métodos e ferramentas que possibilitam a busca individual pelo conhecimento, algo que consegue com sucesso. Além disso, uma análise completa por HPLC implica a realização de um número elevado de passos, mais ou menos complexos e muitas vezes morosos que dificilmente seriam exequíveis em contexto académico. Todavia, e embora os conceitos teóricos (tampão e fase móvel, afinidade pela coluna, inversão da coluna, tempo de retenção, área sob a curva, por exemplo) fossem um dado adquirido, processos como alteração da coluna, preparação da solução SST¹⁰ (*System Suitability Test* ou, em português, Teste de Adequabilidade do Sistema) ou purga dos canais e do injetor mostraram-se mais complexos.

3.2. Análise Externa

3.2.1. Oportunidades

- **Complementaridade entre estágios**

Durante o estágio em farmácia comunitária pude perceber a importância do medicamento, do seu aconselhamento e indicação farmacêutica como objeto de resolução de problemas de saúde menores. Tomei consciência do impacto do farmacêutico na sociedade, como profissional de saúde especialista do medicamento.

⁹ O HPLC é um método cromatográfico que permite a separação, identificação e quantificação de componentes presentes em qualquer amostra passível de dissolver um líquido. Permite identificar compostos em concentrações mínimas. (Waters, 2021)

¹⁰ A composição do *System Suitability Test* varia consoante a composição da amostra a ser analisada. Contém, normalmente, não só o analito a dosear, mas todos os componentes do produto acabado que possam interferir na análise. O objetivo é testar a performance do equipamento de HPLC e verificar o cumprimento dos pré-requisitos descritos no método analítico como simetria dos picos ou resolução.

Durante o estágio no LCQ, pude perceber uma outra faceta do medicamento. Tive oportunidade de acompanhar todo o circuito do medicamento, todas as análises e passos respeitados para que o produto acabado seja detentor da qualidade necessária. A oportunidade de verificar, presencialmente, o cumprimento do que imaginava serem os testes de controlo de qualidade deu-me ainda mais confiança nos produtos, na sua qualidade e segurança. Presenciar a análise completa de produtos de elevada rotação na farmácia como géis tópicos de diclofenac ou suspensões orais de ibuprofeno, por exemplo, foi extremamente enriquecedor dando-me uma visão mais abrangente do medicamento e do seu circuito.

A produção de injetáveis de pequeno e grande volume, viabilizou o contacto com medicamentos injetáveis de uso hospitalar como furosemida, ou metoclopramida injetável, que de outra forma teria sido impossível, contribuindo para a minha formação como profissional de saúde e tornando o meu estágio ainda mais completo.

- **Formas farmacêuticas diversificadas e multiplicidade de tarefas**

Nos Laboratórios Basi são produzidas de formas farmacêuticas líquidas, semissólidas e injetáveis não só de medicamentos, mas também dispositivos médicos, suplementos alimentares e dermocosméticos. O contacto com diversos produtos e formas farmacêuticas produzidas permitiu tornar o meu espectro de conhecimento muito mais abrangente. Além dos produtos comercializados em Portugal, familiarizei-me com produtos utilizados no mercado Americano, Asiático e Africano em países para os quais os Laboratórios Basi exportam, o que aguçou a minha curiosidade sobre a influência do contexto sociocultural e económico na toma de medicamentos.

As especificidades de cada forma farmacêutica conduzem a formas de análise muito distintas o que tornou o meu estágio muito estimulante e nada monótono. Tive oportunidade de fazer análises tão distintas como identificação e doseamento do princípio ativo, conservantes e produtos de degradação por técnicas de HPLC, estudo da densidade, pH, penetrometria (apenas caso das formas farmacêuticas semissólidas) e redispersibilidade o que me permitiu um melhor conhecimento dos produtos e das técnicas analíticas.

Acompanhar estudos de estabilidade em uso e perceber que simulam, de facto, a utilização real do produto aumentou a minha confiança nos mesmos, na sua qualidade, segurança e eficácia.

- **Interação e colaboração entre departamentos do LCQ**

A dimensão e complexidade dos processos na indústria farmacêutica exige a interligação e correlação de todos os departamentos que a constituem para que exista uma atividade

organizada, coordenada e planeada. Todos os departamentos e colaboradores são interdependentes mantendo-se em contacto e interação constantes.

Nos Laboratórios Basi, diversos departamentos (estudos de estabilidade, análise de matérias-primas, análise do produto acabado, validação e desenvolvimento do método analítico e análise de injetáveis de pequeno e grande volume) estão situados no mesmo LCQ. Esta organização espacial próxima permite uma fácil interação entre os diversos setores, possibilitando a junção de análises similares e a partilha de equipamentos e reagentes. Permitiu-me também, enquanto estagiária, ter uma noção generalizada do processo de qualidade e das análises realizadas noutros setores, não ficando restringida ao departamento de estudos de estabilidade.

- **Colaboração entre produção, LCQ e gestão de qualidade**

A completa interligação dos diversos departamentos da organização, mas ao mesmo tempo a sua separação e autonomia, permitem simultaneamente a completa isenção de cada uma das etapas e o estreito conhecimento sobre o processo de produção completo, desde a mistura das matérias-primas até ao produto acabado passando obviamente pelo controlo de qualidade e não esquecendo o acompanhamento regulamentar que está sempre presente. O controlo de qualidade está envolvido em todas as etapas de produção, permitindo gerar dados que auxiliam nas tomadas de decisões na indústria. A estreita colaboração entre produção, LCQ e a equipa de suporte técnico e gestão de qualidade facilitou o contacto e envolvimento em diversas funções que compõem a rotina quotidiana da indústria, dando-me uma visão mais ampliada da indústria como organismo supercomplexo interdependente. Permitiu-me entender, na prática, a abrangência da profissão farmacêutica.

3.2.2. Ameaças

- **Necessidade de transporte próprio para deslocação**

A dependência de transporte privado por ausência de transporte público alternativo infere um custo considerável na deslocação para o local de estágio, se tivermos em conta que um estagiário normalmente não tem rendimentos, mesmo sabendo que a empresa, ajuda a mitigar este problema oferecendo a alimentação, a qual agradeço.

A minha vontade de estagiar nos Laboratórios Basi superou largamente o esforço económico, no entanto acredito que, para futuros colegas, a ausência de transporte público possa ser um entrave a considerar.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estágio curricular nos Laboratórios Basi constituiu o meu primeiro contacto com o setor e mostrou-se uma experiência bastante positiva e estimulante que enriqueceu e solidificou os conhecimentos teóricos adquiridos ao longo do MICF.

O acesso à indústria farmacêutica deu-me uma visão mais alargada e completa da sua dinâmica, estrutura e organização. A abrangência do processo de fabrico de medicamentos e produtos de saúde faz do farmacêutico uma peça fulcral na indústria farmacêutica por possuir capacidades e competências que possibilitam a sua intervenção em qualquer etapa.

Pude verificar o cumprimento do que imaginava serem os testes de controlo de qualidade o que contribuiu para o aumento da confiança nos produtos, na sua qualidade e segurança.

A prevalência de pontos fortes corrobora o balanço extremamente positivo do meu estágio nos Laboratórios Basi. Foi um período de intensa aprendizagem e crescimento, que potenciou o desenvolvimento de competências diferenciadoras e de relevância inquestionável como o espírito crítico, a proatividade e a responsabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

WATERS - **HPLC - High Performance Liquid Chromatography Explained** [Consult. 2 ago. 2021]. Disponível em: https://www.waters.com/waters/en_US/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Explained/nav.htm?cid=10048919&locale=en_US

LABORATÓRIOS BASI - **Laboratórios Basi - Your Health, Our World - Sobre os Basi** [Consult. 5 jul. 2021]. Disponível em: <https://www.basi.pt/sobre-basi/>

Capítulo III

Monografia

Nanobolhas: princípios, aplicações farmacêuticas e perspectivas futuras

Sob orientação da Professora Doutora Carla Vitorino



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

LISTA DE ACRÓNIMOS E SIGLAS

Ang2	Angiopep-2
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BHE	Barreira Hematoencefálica
C₃F₈	Octafluoropropano
DBPC	1,2-dibeenoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DLPC	Dilaurilfosfatidilcolina
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DPPA	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DPPE	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina
DSPC	1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina
FDA	Food and Drug Administration
ELA	Esclerose Lateral Amiotrófica
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentadas
MBs	Microbolhas
NBs	Nanobolhas
PC	Fosfocolina
PCL	Policaprolactona
pDNA	Plasmídeo de DNA
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenoglicol
PFB	Perfluorobutano
PFCs	Perfluorocarbono
PFH	Perfluorohexano
PFP	Perfluoropentano
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
siRNA	Pequeno RNA de Interferência
US	Ultrassons

I. RESUMO

O estudo de estratégias que permitam a administração direcionada de agentes terapêuticos tem sido uma constante, não só para aumentar a sua biodisponibilidade no tecido-alvo, como também para tentar minimizar os efeitos adversos. Nos últimos anos, o uso de sistemas de nanobolhas combinados com ultrassons (US) para administração de fármacos e genes tem vindo a ganhar cada vez mais atenção devido ao seu carácter não invasivo, aplicabilidade local e segurança comprovada. O tamanho reduzido das nanobolhas permite o seu extravasamento dos vasos sanguíneos para os tecidos circundantes e a libertação específica do agente terapêutico, previamente incorporado nas estruturas das bolhas ou adsorvido à sua superfície. Esta monografia pretende descrever, ainda que de forma não exaustiva, os diferentes constituintes do núcleo e camada externa da nanobolha, bem como os seus métodos de produção e estratégias de formulação. O objetivo é explorar a versatilidade estrutural das nanobolhas, as suas propriedades e aplicações como estratégia para administração de agentes terapêuticos com vários pesos moleculares e propriedades físico-químicas distintas: fármacos antineoplásicos, ácidos nucleicos ou oxigénio, entre outros.

O desenvolvimento de nanobolhas constitui assim uma estratégia não viral promissora para administração específica de material genético, protegendo-o da degradação enzimática. As nanobolhas têm adicionalmente demonstrado melhorar a absorção celular de fármacos antineoplásicos e apresentam-se como um transportador eficiente que contribui para o aumento da eficácia terapêutica e para a minimização dos efeitos adversos. Com base nestas evidências, é expectável que as nanobolhas venham a desempenhar um papel primordial em futuras aplicações da nanomedicina.

Palavras chave: nanobolhas, administração de terapêutica direcionada, ultrassons, núcleo gasoso, camada externa.

2. ABSTRACT

Research into strategies that allow targeted delivery of therapeutics is a constant, not only to increase their bioavailability in the target tissue, but also to try to minimize adverse effects. In recent years, the use of combined ultrasound nanobubble systems for drug and gene delivery has gained increasing attention. The reduced size of nanobubbles allows their extravasation from blood vessels into surrounding tissues and the specific release of the therapeutic agent previously associated within the bubble structures or adsorbed on their surface. The use of ultrasound is useful due to its non-invasive nature, local applicability and safety. This monograph envisions to describe, in a non-exhaustive way, the different components of the core-shell structure of the nanobubble, as well as the methods used to fabricate them. The aim is to explore the structural versatility of nanobubbles, their properties and applications as a therapeutic strategy for the delivery of therapeutic agents with different molecular weights and physicochemical properties: genes, chemotherapeutic drugs, oxygen, among others.

The development of nanobubbles is thus a promising non-viral strategy for specific delivery of genetic material, protecting it from enzymatic degradation. Nanobubbles have additionally been shown to improve the cellular uptake of chemotherapeutic drugs and present themselves as an efficient carrier that contributes to increasing therapeutic efficacy and minimizing adverse effects. Based on this evidence, it is expected that nanobubbles will play an important role in future applications of nanomedicine.

Keywords: nanobubbles, targeted therapeutic delivery, ultrasound, gas core, shell.

3. NOTA INTRODUTÓRIA

As microbolhas (MBs) são emulsões gás-líquido constituídas por um núcleo gasoso revestido por um invólucro e têm normalmente um tamanho inferior a 8 μm . O núcleo gasoso é geralmente composto por ar, azoto ou hexafluoreto de enxofre (SF_6) enquanto o invólucro pode ter na sua constituição lípidos, polímeros ou proteínas (por exemplo, albumina). Quando combinadas com a cavitação por ultrassons (US), as MBs são adequadas ao tratamento antitumoral, terapia génica ou terapia medicamentosa. (Liu *et al.*, 2017) Uma grande desvantagem das microbolhas como sistema de administração de fármacos é o seu tamanho relativamente grande (1–10 μm) que impede o seu extravasamento passivo com consequente acumulação no espaço perivascular. Para que seja possível o extravasamento dos vasos sanguíneos e acumulação nos tecidos circundantes e tecidos alvo é necessário que seja aplicado um método ativo como US, por exemplo. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016; Liu *et al.*, 2017) Na injeção intravenosa, as microbolhas circulam exclusivamente na corrente sanguínea, sendo particularmente adequadas para a imagem molecular e administração de fármacos para alvos endoteliais e cardiovasculares. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Geers *et al.*, 2012) Para contornar esta limitação surgem nanoformulações como os lipossomas, as micelas e as nanobolhas.

Há já cerca de vinte anos que se tem especulado sobre a existência de nanobolhas. A primeira imagem de nanobolhas foi obtida em 2000; no entanto, a sua caracterização experimental permanece uma tarefa árdua. (Che e Theodorakis, 2017) Estes nanossistemas foram originalmente projetados como agentes de contraste e só recentemente foi estudada a sua capacidade de administração de fármacos e genes. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Eva *et al.*, 2011) Devido ao seu tamanho inferior a 1 μm , as nanobolhas têm capacidade de penetrar nas camadas profundas do tecido, constituindo sistemas de libertação de fármaco desencadeada por US extravasando a corrente sanguínea. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016; Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Zhao *et al.*, 2013)

4. NANOBOLHAS

Com um tamanho tipicamente inferior a 700nm, as nanobolhas (NBs), também denominadas de “bolhas ultrafinas”, são nanocavidades gasosas com uma estrutura esférica núcleo-invólucro que podem existir à superfície, na interface ou dispersas numa fase líquida. (Michailidi *et al.*, 2019). O intervalo de tamanhos ainda não se encontra bem estabelecido; no entanto, considera-se um tamanho típico compreendido entre 1 e 1000nm, contrastando com os tamanhos consideravelmente superiores das microbolhas. (Thi Phan *et al.*, 2020)

Formulações de nanobolhas são administradas por injeção intravenosa, ultrapassando várias barreiras biológicas até que o fármaco se acumule no tecido alvo. (Fang, Nakamura e Maeda, 2011) Além da capacidade de extravasamento, outras vantagens deste sistema de administração de fármacos são a maior estabilidade e tempo de residência na circulação sanguínea mais prolongado das NBs em relação às MBs. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013) Vários são os métodos associados ao uso de nanobolhas como estratégia para administração de terapêutica direcionada, com o objetivo comum de facilitar o extravasamento de fármaco e a sua absorção no tecido-alvo. (Presset *et al.*, 2020) Quer devido à presença de anticorpos ligados à superfície da nanobolha (Fang, Nakamura e Maeda, 2011) ou como consequência do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (do inglês, *enhanced permeability and retention effect*, EPR), as nanobolhas podem ser transferidas dos vasos sanguíneos para os tecidos circunvizinhos, sendo visualizadas por US após a acumulação no tecido tumoral. (Liu *et al.*, 2017) As nanobolhas podem ainda ser coadministradas com uma solução de fármaco ou pode ser associado um fármaco dentro da estrutura da bolha. Funcionam como núcleos de cavitação para sonoporação induzida por US, formando poros transitórios nas membranas plasmáticas que contribuem para o aumento da permeabilidade celular e aumento da absorção intracelular de fármacos. Através destas estratégias consegue-se uma administração direcionada para tecidos específicos, recorrendo a ultrassonografia em tempo real para visualizar tanto a entrega como a libertação do composto carregado. (Kim *et al.*, 2010)

5. TERAPÊUTICA DIRECIONADA

Apesar do número crescente de fármacos e do desenvolvimento de novas terapias direcionadas, as alternativas terapêuticas para determinadas patologias são ainda muito reduzidas e dispendiosas. A distribuição inespecífica de fármacos, devido às suas propriedades físico-químicas ou características da formulação e a presença de barreiras fisiológicas constituem os principais obstáculos da administração de agentes terapêuticos. Barreiras endoteliais e a barreira hematoencefálica limitam o extravasamento do fármaco do endotélio (compartimento intravascular) para os tecidos (compartimento extravascular), além de que a maioria dos fármacos induz efeitos adversos significativos em tecidos saudáveis. Assim, de modo a oferecer tratamentos eficientes e seguros tem-se investido no estudo da administração de terapêutica direcionada. Os objetivos são, por um lado, aumentar a biodisponibilidade do fármaco especificamente em tecidos alvo e, por outro, diminuir os efeitos colaterais pela minimização de fármaco em circulação. (Presset *et al.*, 2020). Pode ser benéfico destruir uma porção da população celular e, simultaneamente, administrar fármaco às células viáveis restantes (por exemplo, na entrega de fármacos citostáticos a células

cancerígenas) ou ter como finalidade a administração intracelular eficaz de fármaco com morte celular mínima. (Burgess e Porter, 2019)

A administração de terapêutica direcionada pode ser conseguida de forma passiva, segundo a qual o agente terapêutico está incorporado num nanossistema que atinge passivamente o órgão alvo, ou de forma ativa em que o sistema transportador é conjugado com um ligando específico que reconhece o recetor-alvo específico da célula e sobreexpresso no tecido alvo. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013; Cavalli, Soster e Argenziano, 2016)

Nos últimos anos, o uso potencial de sistemas de micro e nanobolhas combinados com os US para administração de fármacos e genes tem vindo a ganhar cada vez mais atenção devido ao carácter não invasivo, aplicabilidade local e segurança comprovada (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013), para além das características de administração direcionada, alta eficiência de transfeção e tolerabilidade. Dentre os diversos tipos de nanobolhas, os lipossomas, têm atraído mais a atenção por serem sensíveis à temperatura e aos US (também chamados de ecogénicos ou sonossensíveis). (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013)

6. ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO DAS NANOBOLHAS

A composição da nanobolha deve privilegiar substâncias seguras, biocompatíveis, biodegradáveis e devidamente regulamentadas. A sua função varia de acordo com as propriedades físico-químicas do material da camada externa; no entanto, tanto o material de superfície como o conteúdo podem ser alterados de modo a conferir um tempo de semivida apropriado ou grupos funcionais específicos que permitam a ligação a um local-alvo do organismo. (Park *et al.*, 2020) A composição da camada externa e dos tensoativos assumem um papel fulcral na estabilidade das nanobolhas. (Khan *et al.*, 2019) Alguns exemplos destes constituintes são ilustrados na Figura 1.

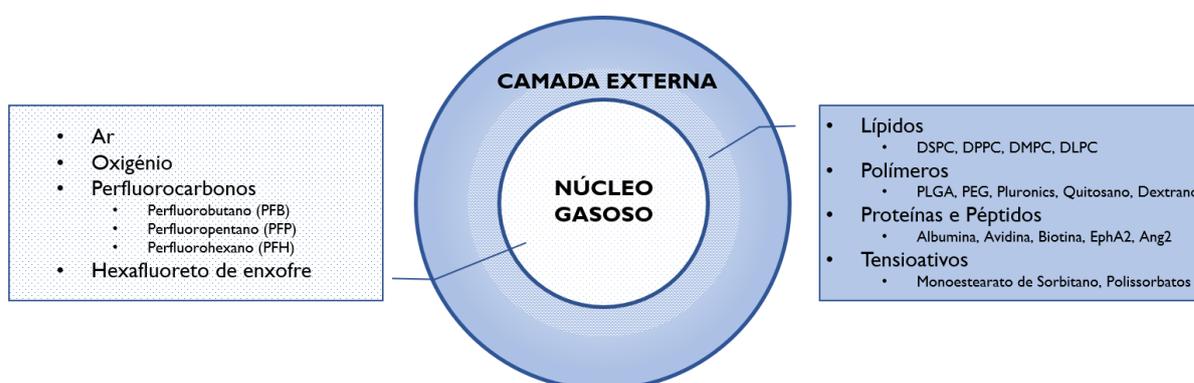


Figura 1: Representação esquemática da estrutura e composição de uma nanobolha. Adaptada de (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016)

6.1. Camada externa

Apesar de não ser um constituinte essencial na formação de bolhas, a composição, espessura e elasticidade da camada externa afeta as trocas gasosas realizadas entre a nanobolha e o meio externo. Pode ter uma influência considerável sobre o tempo de semi-vida das nanobolhas e, conseqüentemente, na estabilidade da nanobolha. (Park *et al.*, 2020) É normalmente constituída por tensoativos, proteínas, lípidos ou polímeros para aumento da estabilidade, evitando a perda de gás, dissolução e coalescência de bolhas. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

A resposta das nanobolhas a estímulos acústicos, como os US, varia de acordo com as propriedades viscoelásticas da camada externa, influenciando a sua eficiência como sistema de transporte de fármacos, pelo que a libertação de fármaco pode ficar comprometida. Por cavitação, o *stress* mecânico provocado pela rápida contração e expansão da bolha, pode enfraquecer o invólucro da bolha, levando-a à sua rutura. Por um lado, camadas externas muito delicadas não impedem a difusão de gás para fora da bolha e são facilmente desestruturadas por pequenas variações de pressão. Por outro lado, camadas externas demasiado rígidas perdem a capacidade oscilatória, diminuindo o efeito ecogénico, ou seja, a capacidade de resposta acústica aquando da irradiação por US.

6.1.1. Lípidos

Lípidos são um conjunto amplo de substâncias biocompatíveis e biodegradáveis onde se incluem, por exemplo os fosfolípidos. (Fahy *et al.*, 2009) Os fosfolípidos são constituídos por cadeias hidrofóbicas e grupos principais hidrofílicos, o que lhes confere a capacidade de se “auto-organizarem”. Quando em contacto com um solvente e na presença de tensoativos, os fosfolípidos organizam-se em torno do gás hidrofóbico, presente no núcleo, criando bolhas. Assim, as caudas hidrofóbicas insolúveis em água estão em contacto com o núcleo gasoso enquanto as cabeças de fosfato hidrofílicas e polares interagem com o ambiente aquoso externo. Esses tensoativos determinam, por exemplo, o tamanho e o potencial zeta das partículas. (Khan *et al.*, 2019)

Quando a camada externa contém fosfolípidos adquire propriedades mais elásticas, variando a estabilidade da nanobolha, em função do comprimento da cadeia do lípido e do seu grau de saturação ou insaturação. O aumento do número de átomos de carbono da cadeia do fosfolípido leva a uma diminuição da tensão superficial, ao aumento da resistência à penetração de gás e ao aumento da viscosidade, o que resulta em bolhas mais robustas, menos ecogénicas e menos esféricas (portanto, cadeias mais curtas formam bolhas mais esféricas). Os lípidos saturados são mais estáveis do que os insaturados. Os lípidos mais frequentemente usados

são lípidos saturados de longa cadeia como, por exemplo: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina (DSPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato (DPPA) ou 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC). (Hettiarachchi *et al.*, 2007)

6.1.2. Polímeros

Uma forma de aumentar a resistência de bolhas baseadas numa monocamada de fosfolípidos consiste na adição de polímeros à formulação. Um invólucro polimérico dificulta a difusão do gás nuclear, aumenta a estabilidade do sistema de nanobolhas e o seu tempo de vida útil. Além disso, favorece a vetorização de terapêutica por permitir a inclusão de ligandos específicos na superfície da bolha e a incorporação de maiores quantidades de fármaco. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013)

Os polímeros mais comumente utilizados são poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), policaprolactona (PCL), polietilenoglicol (PEG), Pluronic e polissacarídeos como quitosano e os seus derivados e dextrano.

A reticulação¹¹, química ou física, da camada externa surge como forma de permitir a produção de sistemas de nanobolhas estáveis na presença de US. A reticulação química de cadeias poliméricas confere elasticidade e estabilidade às bolhas poliméricas. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016)

6.1.3. Proteínas

Ao utilizar bolhas como metodologia para administração direcionada de fármacos e/ou ácidos nucleicos, interessa garantir uma elevada afinidade para locais-alvo. Através, por exemplo, da modificação com anticorpos é conseguida uma acumulação de bolhas no local-alvo, aumentando a eficiência da administração sistémica por meio de US. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

Um método de desenvolvimento de bolhas modificadas por anticorpos foi a interação avidina-biotina. Introduzir, no invólucro da bolha, um fosfolípido com um grupo PEG-biotina contribui para a formação de bolhas revestidas com lípido biotinilado. Estas bolhas contendo biotina podem ser posteriormente incubadas com avidina que permite a fixação subsequente de nanopartículas biotiniladas (contendo fármaco). Apesar da simplicidade, a aplicação *in vivo* do método é limitada devido à imunogenicidade da avidina em humanos. (Geers *et al.*, 2012)

¹¹ O fenómeno de reticulação polimérica caracteriza-se pela produção de polímeros tridimensionais a partir de moléculas lineares. Polímeros de cadeia linear ou ramificada são interligados por ligações covalentes, por processos de *crosslinking* ou reticulação, com consequente aumento de rigidez.

Têm sido também investigados péptidos que se ligem especificamente a locais alvo para a modificação das bolhas. Foram desenvolvidas, com sucesso, formulações de nanobolhas modificadas com péptidos que se ligam ao recetor hepatocelular envolvido na síntese de eritropoietina A2 (EphA2) em células tumorais, (Xie *et al.*, 2015) ao recetor 2 do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR2) de endotélio tumoral, (Pillai *et al.*, 2010) à integrina das células endoteliais, (Yan *et al.*, 2015) entre outros. Foram também preparadas nanobolhas modificadas com Angiopep-2 (Ang2) ou Ang2 combinado com PEG de curta e longa cadeia. Ang2 é um péptido importante na administração direcionada de fármacos, genes ou outros péptidos por apresentar capacidade de ligação a tecidos cerebrais. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

É relevante salientar que, apesar de presentes em diversas aplicações biomédicas e biotecnológicas, as proteínas sofrem processos de oxidação e desnaturação térmica que aumentam a sua instabilidade quando armazenadas a longo prazo. As proteínas podem simplesmente perder a sua atividade ou, em alguns casos, formar grandes agregados capazes de desencadear resposta imunológica, diminuindo a eficácia a longo prazo, com potencial risco para o utente. O foco tem sido o desenvolvimento de formulações com proteínas com um maior tempo de armazenamento. (Bull *et al.*, 2019)

6.1.4. Tensioativos

Existem várias estratégias para aumentar a estabilidade das nanobolhas, nomeadamente a presença de tensioativos na interface gás-líquido, a redução da diferença de pressão de Laplace, limitação da difusão do gás e controlo da estrutura interfacial. (Kwan e Borden, 2012) Bolhas de tamanho nanométrico podem permanecer estáveis se contiverem uma proporção adequada de tensioativos na camada externa. (Khan *et al.*, 2019)

A camada externa da bolha aplica pressão, tensão superficial, no núcleo gasoso, afetando a estabilidade da bolha. À medida que o raio da bolha diminui, a diferença de pressão dentro e fora da bolha aumenta, o que causa um aumento da tensão superficial destabilizando a bolha. A adição de tensioativos à formulação forma uma monocamada molecular na interface que diminui a tensão interfacial e limita a diferença de pressão entre o interior e o exterior de uma bolha. (Kwan e Borden, 2012) O tipo de componentes utilizados (tensioativos ou polímeros) fazem variar a tensão interfacial e a carga, a flexibilidade, a hidrofobicidade e estrutura molecular. O uso de pares de tensioativos, também denominados co-surfactantes, possibilita um efeito sinérgico de tensioativos, melhorando as características da nanobolha pela redução da tensão interfacial. A capacidade de interação e, portanto, eficiência dos tensioativos depende não só da sua afinidade para o meio, mas também do tamanho da sua cadeia alquílica.

Quanto mais longa a cadeia, maiores serão as forças de atração de Van der Waals, promovendo uma coesão e compactação de cadeias mais fortes e, portanto, maior estabilidade da bolha. Alguns tensoativos comumente utilizados são o monoestearato de sorbitano (Span[®] 60), e polissorbatos (Tween[®]). (Su *et al.*, 2021)

6.2. Núcleo gasoso

A solubilidade do gás presente no núcleo gasoso da nanobolha desempenha um papel essencial na sua estabilidade, devido à sua interação com o solvente do meio externo. É natural que bolhas de ar simples se dissolvam muito rapidamente no sangue como consequência da pressão de Laplace e do metabolismo do oxigênio. No entanto, o encapsulamento de gases insolúveis na água permite reduzir a taxa de dissolução do gás interno das nanobolhas, de modo a aumentar o tempo de meia-vida da nanobolha.

Uma estratégia adotada para projetar nanobolhas com maior longevidade envolve o uso de um gás inerte com muito baixa solubilidade aquosa, como perfluorocarbonos (PFCs), para a composição do núcleo gasoso.

Os PFCs, por exemplo, perfluorobutano (PFB), perfluoropentano (PFP) ou perfluorohexano (PFH), são compostos de flúor seguros para o corpo humano. A estabilidade e inércia química e biológica destes compostos é explicada pela presença de ligações intramoleculares C-C e C-F fortes que contrastam com as interações intermoleculares muito fracas. PFCs líquidos, tais como os gases, apresentam uma coesividade intermolecular muito baixa que se reflete em pressões de vapor mais altas (em relação ao peso molecular), baixas tensões superficiais e solubilidade reduzida em água. (Krafft e Riess, 2007; Rossi, Waton e Krafft, 2012)

Aparentemente, estes gases são os únicos que combinam baixos coeficientes de Ostwald (um baixo coeficiente de partição entre a fase gasosa e solução aquosa), pressões de vapor saturado relativamente altas e são biologicamente inertes razão pela qual são amplamente utilizados no fornecimento de oxigênio por meio de injeção intravenosa, para administração de fármacos e em vários ensaios clínicos. (Park *et al.*, 2020)

O tipo de fase gasosa pode atuar como co-tensoativo na interface, afetando as propriedades da bolha. Quando as moléculas de fluorocarbono são adsorvidas na superfície de DPPC, ambos os compostos interagem através de forças de atração fazendo diminuir as forças de interação mútua entre as moléculas de DPPC. Assim, a co-adsorção faz variar a tensão superficial, levando a uma fluidificação da monocamada na interface. (Krafft, Fainerman e Miller, 2015) Quando o PFH está presente na fase gasosa, a velocidade de adsorção de alguns fosfolípidos (dilaúrilfosfatidilcolina (DLPC), DMPC e DPPC) aumenta. (Krafft, Fainerman e Miller, 2015)

6.3. Estratégias para administração de terapêutica

Nanobolhas com diversos tipos de estrutura têm sido especificamente desenvolvidas para acomodar moléculas com vários pesos moleculares e propriedades físico-químicas distintas. Tanto compostos gasosos como micro ou macromoléculas lipo ou hidrofílicas podem ser associadas dentro das estruturas das bolhas ou adsorvidas na sua superfície (Figura 2A), recorrendo a diversas abordagens tecnológicas previamente estudadas para microbolhas. (Geers *et al.*, 2012)

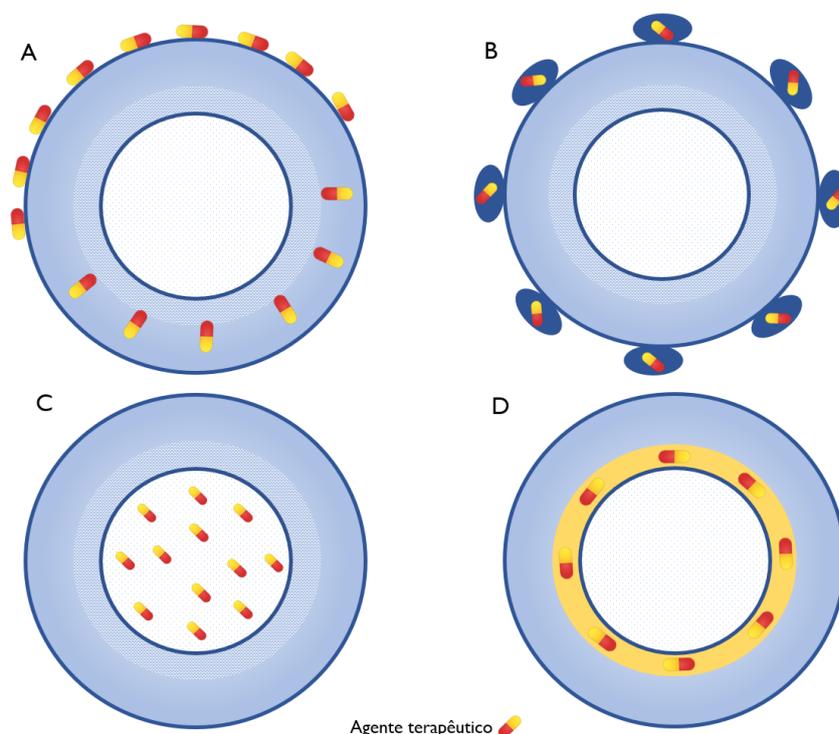


Figura 2: Representação esquemática das diferentes estratégias para incorporação de agentes terapêuticos (i.e. fármacos e ácidos nucleicos) na estrutura da nanobolha.

- (A) Incorporação no interior ou à superfície do invólucro da bolha;
- (B) Incorporação numa nanoestrutura ligada à superfície da nanobolha;
- (C) Incorporação no interior do núcleo da bolha;
- (D) Incorporação por dissolução numa camada interna oleosa adicionada ao invólucro.

6.3.1. Incorporação no interior ou à superfície do invólucro da bolha

A molécula terapêutica, pode ser associada na camada superficial do invólucro da nanobolha por interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, forças de Van der Waals ou simplesmente por encapsulamento físico. (Figura 2A) (Tinkov *et al.*, 2008)

Um agente terapêutico hidrofóbico, na forma não ionizada, pode ser incorporado diretamente na camada externa de uma nanobolha lipídica. Todavia, a espessura reduzida da monocamada fosfolipídica reduz a quantidade de fármaco passível de incorporação. Por outro lado, quando a camada externa é constituída por lípidos ou polímeros carregados, moléculas carregadas, como doxorrubicina ou ácidos nucleicos, podem ser facilmente acopladas por interação eletrostática. (Geers *et al.*, 2012)

Após administração, tanto a albumina sérica como outros constituintes do sangue têm capacidade de interagir eletrostaticamente com a nanobolha carregada, o que pode provocar a libertação prematura da molécula terapêutica, antes da sua chegada ao tecido alvo. Para superar esta limitação têm sido desenvolvidos vários sistemas multicamada cujo objetivo é não só proteger o fármaco da degradação enzimática e das interações com constituintes do sangue, mas também aumentar a quantidade de fármaco incorporada e o tempo de semi-vida *in vivo*. (Geers *et al.*, 2012)

O revestimento multicamada é obtido por técnicas de deposição camada por camada, adsorvendo sequencialmente polímeros com carga oposta na superfície das nanobolhas. Por exemplo, a doxorubicina, um fármaco carregado positivamente, pode ser incluído numa camada diferente de polieletrólitos carregados negativamente. (Geers *et al.*, 2012)

6.3.2. Incorporação numa nanoestrutura ligada à superfície da nanobolha

Alternativamente, os fármacos e ácidos nucleicos podem ser carregados numa nanoestrutura que, posteriormente, se liga à superfície das nanobolhas por interações ligando-recetor, por exemplo. (Figura 2B) A fixação de vários reservatórios à superfície da nanobolha aumenta a capacidade de carga e permite o armazenamento de diferentes tipos de fármacos.

Exemplos de nanoestruturas podem ser ciclodextrinas ou nanopartículas poliméricas conjugadas com moléculas terapêuticas e funcionalizadas, ou não, com PEG. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016) Outro exemplo, são nanogotículas híbridas de albumina-PEG que encapsulam moléculas terapêuticas. (Lee *et al.*, 2015)

6.3.3. Incorporação no interior do núcleo da bolha

Quando as propriedades físico-químicas do fármaco permitem a sua solubilização no núcleo, este pode atuar como reservatório. (Figura 2C) Fármacos lipofílicos podem ser dissolvidos diretamente em PFC ou com recurso a um co-solvente para facilitar a dissolução. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016)

6.3.4. Incorporação por dissolução numa camada interna oleosa adicionada ao invólucro

Uma estratégia para aumentar a capacidade de carga da nanobolha passa pela inclusão de uma camada oleosa, no núcleo de nanobolhas revestidas por lípidos, para dissolver e armazenar fármacos lipofílicos e hidrofóbicos, como paclitaxel. (Figura 2D) (Tinkov *et al.*, 2008) Formam-

se, assim, liposferas acusticamente ativas utilizadas na administração de fármacos antineoplásicos.

A cavitação do núcleo gasoso, induzida por US, tem como consequência a variação de volume da liposfera. Consequentemente, a integridade da estrutura da bicamada pode ser perturbada, causando poros ou ruptura de toda a liposfera que contribuem para o aumento da permeabilidade e libertação instantânea da molécula carregada. (Geers *et al.*, 2012)

7. MÉTODOS DE PRODUÇÃO

Podem ser consideradas várias estratégias para produzir nanobolhas, nomeadamente manipulação de microbolhas preformadas ou formulação *ab initio* de sistemas à nanoescala. Além disso, métodos, como cavitação, eletrólise, aplicação de membrana nano-porosa e sonoquímica recorrendo a US têm sido também usados para criar pequenas bolhas. Apesar do elevado rendimento e baixo custo de produção, técnicas como a sonicação ou emulsificação por homogeneização de elevada velocidade, não oferecem um controlo suficiente sobre o tamanho e a uniformidade das bolhas. Para tentar colmatar estas falhas, têm sido estudadas outras técnicas como emulsificação de membrana, ou microfluídica. (Stride e Edirisinghe, 2008)

7.1. Manipulação de microbolhas pré-formadas

7.1.1. Centrifugação e flutuação

O processo inicia-se com a preparação, por ultrassonicação, de microbolhas preenchidas com PFC e revestidas por tensioativo. É importante que constituintes como o Span 60, PEG e NaCl estejam presentes na formulação. (Xing *et al.*, 2010) Após sonicação, as microbolhas autossegregam por flutuação, estratificando por tamanho. Realiza-se, posteriormente, centrifugação diferencial para obter uma subpopulação de bolhas de tamanho nanométrico com uma distribuição de tamanho unimodal. As bolhas isoladas permaneceram estáveis por mais de duas semanas sob a proteção de gás perfluoropropano. (Xing *et al.*, 2010)

7.1.2. Extrusão a baixa temperatura e vaporização acústica de gotículas

Como o PFC tem um ponto de ebulição muito baixo, -2°C , a formação de gotículas líquidas por técnicas de microfluídica ou sonicação podem ser um desafio. O método de extrusão a baixa temperatura envolve a condensação de gás a temperaturas reduzidas e/ou pressões aumentadas. As gotículas são produzidas pela condensação de PFC a temperaturas reduzidas

que é seguidamente encapsulado em cápsulas lipídicas por extrusão de membrana. (Zullino et al., 2018)

O processo de formulação das gotículas envolve, primeiramente, a deposição de uma camada de tensoativo em torno de uma gota de PFC, tipicamente decafluoropentano, em água. (Peyman et al., 2016) Os resíduos de vinilo apresentam boa capacidade de adesão à camada de tensoativo, por isso, seguidamente é depositado um polímero hidrofílico modificado com uma fração vinílica, formando a camada mais externa da nanobolha. Podem ser desenvolvidos sistemas multicamadas por deposição sequencial, camada por camada, de polímeros com carga oposta. Por último, ocorre polimerização de radicais livres para reticular as cadeias vinílicas laterais modificadas formando o invólucro de polissacarídeo em torno do núcleo líquido de PFCs. (Capece et al., 2013) Antes da irradiação com US estas vesículas poliméricas normalmente sedimentam em água devido à maior densidade do núcleo de decafluoropentano líquido. Quando irradiadas, a energia fornecida pelos US faz aumentar a pressão e a temperatura no interior da bolha. Ocorre então a expansão térmica e transição de fase do PFC do estado líquido para o estado gasoso, formando nanobolhas. Este fenómeno é conhecido como vaporização acústica de gotículas (do inglês *acoustic droplet vaporization*, ADV). Após o término da exposição aos US ocorre reversão do processo e as bolhas regressam ao seu estado inicial na forma de gotículas. (Capece et al., 2013) A vaporização acústica de gotículas causa transição de fase do PFC com consequente aumento, em cerca de 3 a 6 vezes, do diâmetro médio, dependendo do tamanho da gota inicial, da pressão atmosférica e da densidade do PFC selecionado. (Khan et al., 2019) A reticulação química das cadeias poliméricas confere a elasticidade necessária aos invólucros das bolhas de modo a que seja possível o aumento e diminuição do volume sem que a integridade da bolha fique comprometida. (Capece et al., 2013; Zullino et al., 2018)

7.2. Formulação *ab initio* de sistemas em escala nanométrica

Devido à característica de auto-organização dos fosfolípidos, bolhas com este revestimento podem ser sintetizadas usando uma variedade de técnicas. (Khan et al., 2019) As mais comuns são a sonicação ou agitação mecânica, como fonte de energia para formar bolhas, seguidas de várias etapas mais ou menos complexas para anexar um agente terapêutico, dependendo da sofisticação da camada externa. Apesar de menos utilizadas, é importante referir também técnicas de microfluídica e emulsificação. (Johan et al., 2018)

7.2.1. Método de cavitação

A formação de NBs acontece quando, por cavitação, a fase líquida homogênea passa por uma mudança de fase devido à redução repentina da pressão abaixo de um valor crítico. A cavitação é comumente induzida pela passagem das ondas ultrassônicas (cavitação acústica) ou por variações de alta pressão no líquido que flui (cavitação hidrodinâmica). (Thi Phan *et al.*, 2020)

- **Cavitação acústica**

A cavitação acústica pode ser criada pela propagação dos US através do líquido levando a variações de pressão com consequente formação de bolhas. A diminuição da pressão, abaixo do valor da pressão de vapor saturado, faz com que a onda ultrassônica promova a formação de bolhas de gás, uma vez que os ciclos de compressão-expansão ajudam a separar os gases dissolvidos. (Thi Phan *et al.*, 2020) Quando acima do valor crítico, as bolhas expandem e contraem em grau semelhante, produzindo vibrações lineares nos tecidos vivos, em resposta aos US. No entanto, quando o valor crítico é ultrapassado, os US causam uma vibração não linear, onde as bolhas se expandem mais do que contraem, até que são destruídas. (Park *et al.*, 2020)

- **Cavitação hidrodinâmica**

Quando o fluido em movimento é submetido a uma redução da pressão (por sucção – vácuo, por exemplo), ocorre vaporização e geração de bolhas. O tamanho das bolhas varia de acordo com a pressão e temperatura aplicados ao fluxo do fluido. (Semat e Katz, 1958)

O gerador do tipo Venturi baseia-se no mecanismo de cavitação hidrodinâmica e tem sido amplamente utilizado devido à sua facilidade de transposição de escala e manuseamento. É constituído por três partes: fluxo de entrada, túbulo e fluxo de saída cônico e, tanto o gás como o líquido, são transferidos simultaneamente através do tubo de Venturi para formar a bolha. Quando o fluido pressurizado é introduzido na parte tubular, a velocidade do fluxo do líquido aumenta, enquanto a pressão se reduz em comparação com a secção de entrada o que leva à cavitação. (Thi Phan *et al.*, 2020)

Por requerer equipamento simples e estar associado a baixo custo de manutenção, a cavitação hidrodinâmica tem sido amplamente utilizada, constituindo um dos modos mais baratos e energeticamente mais eficientes para produzir NBs. Além disso, a cavitação hidrodinâmica é usada no sistema de flutuação de nanobolhas. (Khodadadi Darban e Ahmadi, 2013)

As propriedades dos líquidos, por exemplo, pressão de vapor, viscosidade, temperatura e tensão superficial, presença de gases dissolvidos e constituintes do meio líquido, por exemplo, tensoativos, são um dos parâmetros que mais afetam os processos cavitacionais. A eficiência da cavitação hidrodinâmica e o rendimento geral da cavitação são afetados não só pela pressão

e velocidade da entrada do líquido no sistema, como também pelas suas propriedades físico-químicas ou pelas características do próprio sistema. (FAN Maoming, TAO Daniel, HONAKER Rick, 2010)

7.2.2. Método de eletrólise

Um método de geração de NBs pode passar pelo recurso a reações químicas, como a eletrólise. A eletrólise da água implica a decomposição da água em hidrogénio e oxigénio gasosos. Quando a concentração do gás produzido atinge o nível de supersaturação formam-se nanopartículas estáveis, tanto na solução catódica como na anódica. As partículas da solução anódica são nanobolhas de oxigénio e as partículas da solução catódica são nanobolhas de hidrogénio. (Thi Phan *et al.*, 2020)

7.2.3. Agitação mecânica

O método de agitação mecânica é uma abordagem comum para a produção de micronanobolhas com revestimento de fosfolípidos (Hernandez *et al.*, 2018) e pode ser alcançada agitando uma formulação líquida contendo estabilizadores de bolha juntamente com um gás ou recorrendo a um dispositivo misturador, como um homogeneizador, para misturar o líquido e o gás. (Johan *et al.*, 2018, 2019)

Inicialmente, é preparada uma formulação lipossomal por um método convencional, hidratação do filme fosfolipídico, inversão de fase ou injeção de etanol. (Hernandez *et al.*, 2018) Assim, os fosfolípidos dissolvidos numa mistura de solventes (clorofórmio, metanol, amónia, ou água, por exemplo) que é depois removida por evaporação rotativa. As amostras são também submetidas a vácuo para remoção do solvente remanescente. A mistura de lípidos é dispersa por agitação numa solução tampão (tampão fosfato (Johan *et al.*, 2018) ou tampão HEPES/NaCl (Rossi, Waton e Krafft, 2012), por exemplo), seguida de sonicação, produzindo dispersões de lipossomas. Esta dispersão lipossomal é colocada em frascos e o espaço remanescente dos frascos é preenchido com um gás que mais tarde formará os núcleos das bolhas. (Johan *et al.*, 2018) Os frascos são colocados num agitador mecânico e agitados a vários milhares de oscilações por minuto para obtenção de um sistema homogéneo. (Hernandez *et al.*, 2018)

7.2.4. Sistema de membrana adaptado e modificado

Outro método possível para a criação de NBs implica o uso de uma membrana como meio para dispersão de líquido e gás. A fase gasosa, composta por gases como ar, azoto ou oxigénio, sofre compressão através dos poros de uma membrana imersa num líquido que pode conter

tensioativos, originando NBs. Podem ser utilizadas membranas cerâmicas nano-porosas ou membranas de vidro poroso, por exemplo. O diâmetro das NBs pode ser controlado pelo tamanho dos poros da membrana, uma vez que o diâmetro médio da bolha é 8,6 vezes maior do que o diâmetro médio dos poros. (Thi Phan *et al.*, 2020)

7.2.5. Sonicação

Independentemente do tipo de sonicador utilizado, a finalidade da sonicação é semelhante: gerar NBs na presença de um gás fluorado e de um líquido contendo estabilizadores de bolha que se vão misturar com um gás. (Johan *et al.*, 2019) Por causa da sua baixa toxicidade e baixa solubilidade em água, gases como hexafluoreto de enxofre, perfluoropropano ou perfluorobutano, são os mais comumente utilizados. (Johan *et al.*, 2019; Rossi, Waton e Krafft, 2012) Além disso, devido aos baixos pontos de ebulição, os gases de fluorocarbono podem ser facilmente evaporados quando expostos aos efeitos térmicos dos US. (Zhao *et al.*, 2013) Este processo envolve a dispersão de gás ou líquido numa suspensão do material de revestimento adequado usando US de alta intensidade. Tal promove a emulsificação do gás ou líquido para formar uma suspensão de bolhas/gotas na superfície das quais vai ser automaticamente adsorvida uma camada de proteína ou tensioativo, é. Uma vez que a estabilidade das bolhas é limitada na água, é necessária a sua preparação extemporânea ou preservação após a preparação. A maneira mais comum de preservar as dispersões de bolhas é a liofilização com um crio-protetor. (Johan *et al.*, 2019)

NBs preparadas por sonicação têm sido utilizadas com sucesso na administração de plasmídeo de DNA (pDNA), pequeno RNA de interferência (siRNA) e cumarina. (Zhao *et al.*, 2013)

7.2.6. Emulsificação por homogeneização de elevada velocidade

Com o recurso a um homogeneizador de elevada velocidade podem ser preparadas micro-nanobolhas revestidas com polímeros, lípidos ou proteínas. Este método envolve a emulsificação do polímero previamente dissolvido num solvente suficientemente volátil. É usado ainda um segundo solvente, imiscível com o polímero e água como estabilizador da nanobolha. Quando o solvente do polímero começa a evaporar, o polímero precipita na interface. Após a etapa de liofilização, o solvente é removido, deixando a matriz da emulsão. Em seguida, o sistema liofilizado é preenchido com o gás no núcleo da bolha. (Khan *et al.*, 2019)

7.2.7. Microfluídica

A tecnologia microfluídica permite o controlo preciso de pequenos volumes e, portanto, contribui para a produção reprodutível de nanobolhas altamente uniformes, com diâmetro adequado. Permite também o controlo da velocidade de produção, por monitorizar o fluxo de líquido e a pressão do gás, num dispositivo com geometria adequada (Pulsipher *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2013) O dispositivo microfluídico consiste em dois canais opostos nos quais é introduzida a solução líquida, e um canal central pelo qual passa um fluxo de gás. (Peyman *et al.*, 2016)

7.3. Gerador de nanobolhas

O mecanismo de conceção das NBs condiciona as propriedades das NBs pelo que é de suma importância o *design*, construção e material que compõem o gerador de NBs. O objetivo é que os geradores permitam a produção de NBs uniformes, com tamanho semelhante e estáveis. (Michailidi *et al.*, 2019). Para isso, Mitropoulos e Bomis projetaram um aparelho que permite gerar e recolher bolhas com tamanhos diferentes (microbolhas, nanobolhas e ultra nanobolhas) com recurso a três geradores diferentes. Primeiramente, no gerador 1, a fase líquida é misturada com um gás para gerar microbolhas no líquido. Seguidamente, no gerador 2, faz-se passar o líquido com MB através de um material macroporoso, gerando nanobolhas. Devido às forças rotacionais ou vibracionais, o gerador 3 proporciona a formação de ultra-nanobolhas a partir das NB previamente produzidas. (Mitropoulos *et al.*, 2016)

8. RELEVÂNCIA DOS ULTRASSONS

8.1. Ultrassons

Os US podem ser definidos como ondas sonoras de alta frequência (superiores a 20 kHz), produzidas por um sensor portátil designado por transdutor, que uma vez aplicadas na superfície do corpo, podem ser absorvidas e atenuadas em tecidos humanos após reflexão ou refração. (Li *et al.*, 2020)

Apesar do interesse pela administração de agentes terapêuticos mediada por US, recorrendo a nanobolhas, estas podem ser utilizadas sem o recurso a US. A camada externa de fosfolípidos é permeável ao gás e à medida que este se difunde, a bolha “encolhe” e, eventualmente, rompe-se devido ao aumento da pressão externa de Laplace. Ocorre então libertação do agente terapêutico encapsulado. (Khan *et al.*, 2019)

O interesse pelo estudo da administração de terapêutica mediada por US deve-se à sua segurança e baixo custo e tem-se intensificado desde meados dos anos 90. Os US são o estímulo externo desencadeador da administração do fármaco no local alvo, constituindo uma forma de facilitar a internalização de compostos impermeáveis à membrana plasmática em células vivas. Tem-se vindo a mostrar que os US induzem a absorção de fármacos de baixo peso molecular, ácidos nucleicos (pDNA, siRNA, mRNA), péptidos e proteínas. A eficiência de administração de fármaco mediada por US pode ser melhorada quando são combinadas com MBs ou NBs e um gás de contraste de ultrassons. Além desta, existem várias outras combinações de nanopartículas com estímulos externos para facilitar não apenas a administração de terapêutica, mas também imagens óticas, imagens de ressonância magnética, imagens nucleares e tomografia computadorizada. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020) (Lentacker *et al.*, 2014)

Devido ao baixo custo, elevada segurança, conveniência operacional e excelentes resoluções espaço-temporais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou que os US devem ser disponibilizados mundialmente como ferramenta auxiliadora no processo de diagnóstico. (Groen *et al.*, 2011)

Devido à incompatibilidade de impedância acústica¹² entre sangue, tecidos e órgãos diferentes, várias doenças podem ser diagnosticadas pela diferenciação de imagem de US.

Os US têm sido amplamente utilizados para administração direcionada de fármacos, terapia génica, tratamento antitumoral e trombólise, recorrendo a cavitação por US, sonoporação e ablação térmica. (Liu *et al.*, 2017)

8.2. Sonoporação

A exposição aos US tem a capacidade de aumentar transitoriamente a permeabilidade da membrana celular facilitando a administração de terapêutica. Este fenómeno ocorre durante ou logo após o tratamento com US, sendo denominado sonoporação e pode ser reversível ou irreversível (causador de morte celular), dependendo da intensidade e duração. É possível que o aumento da permeabilidade aconteça devido a alterações transitórias nos canais de água ou poros na membrana plasmática, como a aquaporina. (Burgess e Porter, 2019; Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Ogawa *et al.*, 2001) O aumento eficiente da permeabilidade da

¹² A impedância acústica consiste na resistência à propagação de US num tecido específico e é determinada pela densidade do tecido e pela velocidade do som dentro do tecido. Como a velocidade de propagação nos tecidos moles sofre variações pouco significativas, a impedância acústica depende principalmente da densidade dos tecidos. Quando o som avança de um meio para outro, a relação entre as impedâncias acústicas de dois meios dita quanta energia será refletida ou transmitida na interface desses meios e, quanto maior a proporção, mais energia será refletida na interface. (Mattoon e Nyland, 2014; Nummela *et al.*, 2007)

membrana celular resulta numa distribuição melhorada de fármaco nos tecidos e na administração intracelular de moléculas, nanopartículas e outros agentes terapêuticos. (Chowdhury *et al.*, 2020) Além disso, combinando a exposição aos US, mesmo que apresente baixa intensidade, e o recurso a nanobolhas, a permeabilidade da membrana celular vai aumentar ainda mais, conduzindo a uma maior absorção de fármacos e genes. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020) As principais desvantagens deste método são a degradação do citoesqueleto celular e a baixa seletividade. (Lukianova-Hleb *et al.*, 2011)

É de notar que a interação dos US com o tecido pode induzir efeitos mecânicos (US de baixa intensidade origina cavitação estável), químicos (US de elevada intensidade conduz à cavitação inercial com colapso da bolha) e/ou térmicos (aplicação de US na ausência de bolhas). Além disso, qualquer aumento de temperatura, provocado pela exposição aos US, pode alterar o estado físico-químico das membranas celulares e torná-las mais sensíveis à deformação. (Lentacker *et al.*, 2014)

8.3. Cavitação

Devido ao seu núcleo cheio de gás e, portanto, compressível, as bolhas podem responder às ondas de pressão dos US. Este processo de crescimento e contração alternados (oscilações volumétricas) é denominado de cavitação e pode facilitar a libertação do fármaco, aumentar a absorção do mesmo ou ser usado para a obtenção de imagens. (Lentacker *et al.*, 2014; Sirsi e Borden, 2014)

De acordo com o mecanismo de cavitação, o gás dentro da bolha é eluído, formando uma forte onda de choque, uma força de corte e um microjato, causando alterações físicas nas estruturas celulares circundantes. Pode então ser explorada como mecanismo para aumentar a permeabilidade da membrana celular. (Park *et al.*, 2020; Tezel e Mitragotri, 2003) Quando uma bolha é exposta a US para causar cavitação, é necessário decidir os parâmetros operacionais com base na eficiência do aumento da permeabilidade. Assim, a ocorrência de cavitação estável ou inercial é influenciada por vários fatores, incluindo as características da onda ultrassónica, o tamanho e a composição da bolha, o ambiente circundante e tecidos-alvo. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Park *et al.*, 2020)

8.3.1. Cavitação estável

Quando expostas a baixas pressões acústicas (baixa intensidade de US, entre $0,3 \text{ W/cm}^2$ e 3 W/cm^2), as MBs e NBs sofrem cavitação estável, um processo que consiste em oscilações estáveis de micro/nanobolhas. (Chowdhury *et al.*, 2020)

8.3.2. Cavitação inercial

A cavitação inercial ocorre em intensidades mais elevadas de US (superiores a 3 W/cm²), responsáveis pela oscilação vigorosa e instável da bolha, resultando no seu crescimento e consequente colapso. (Chowdhury *et al.*, 2020)

9. PROPRIEDADES DAS NANOBOLHAS

9.1. Tamanho e uniformidade

As propriedades, estabilidade e uniformidade das nanobolhas são condicionadas por parâmetros que fazem variar o tamanho médio das nanobolhas. O volume das bolhas varia não só devido a fatores de formulação, como a composição do revestimento e a concentração de tensoativo, mas também a parâmetros de processo como o teor de oxigénio e dióxido de carbono dissolvidos, variação de pressão no tubo de cavitação, temperatura e intervalo de tempo após a geração de nanobolhas. (FAN Maoming, TAO Daniel, HONAKER Rick, 2010)

9.2. Estabilidade

A pressão de Laplace é a diferença de pressão entre o interior e o exterior da bolha e está inversamente relacionada com o tamanho da bolha. É dada pela seguinte expressão:

$$\Delta P = P_{interna} - P_{externa} = \frac{2\sigma}{r}$$

Sendo $P_{interna}$ a pressão no interior da bolha, $P_{externa}$ a pressão no exterior da bolha, σ a tensão interfacial e r o raio da bolha.

Bolhas menores terão valores de pressão mais elevados. A tensão superficial faz com que a pressão no interior da bolha seja maior que a pressão no exterior, criando-se um gradiente de pressão bastante propício à dissipação do gás interno. (Thi Phan *et al.*, 2020)

A saída de gás do interior da bolha origina uma diminuição de volume, aumentando a pressão de Laplace e acentuando a velocidade de dissipação do gás até que a bolha atinge um ponto de rutura.

Uma emulsão de nanobolhas é termodinamicamente instável uma vez que a energia livre do sistema é minimizada quando a fase gasosa se separa completamente do meio líquido, formando duas fases. O excesso de energia livre é armazenado na interface gás/líquido. O amadurecimento de Ostwald impede a preparação de nanossistemas estáveis, uma vez que a difusão do gás promove o crescimento de bolhas maiores em detrimento da diminuição, e eventual desaparecimento, de bolhas de menores dimensões. (Kooiman *et al.*, 2014)

Uma elevada estabilidade *in vitro* permite que o conteúdo da bolha permaneça constante por um longo período de tempo, enquanto que uma elevada estabilidade *in vivo* permite a libertação controlada do fármaco por um período de tempo mais longo. A velocidade de dissolução da bolha *in vivo* dependerá principalmente da pressão de Laplace, tendendo a ser menor do que a estabilidade da bolha *in vitro* e é determinada por vários fatores, como a composição da camada externa e o tipo de gás que compõe o núcleo.

Devido à sua relevância, a manutenção da estabilidade deve ser tida em consideração não só nas características da formulação, como também no processo de produção e nas condições de armazenamento.

9.2.1. Influência da formulação

Para estabilizar as bolhas e evitar a sua coalescência, não só o núcleo gasoso deve ser composto por um gás inerte de alto peso molecular que, devido à sua baixa solubilidade no meio circundante, melhore a longevidade das nanobolhas, mas também pode existir um revestimento com um agente estabilizador.

Teoricamente, o tempo de vida útil seria de alguns segundos. No entanto, o que se verifica é um aumento para meses em vez de segundos (Thi Phan *et al.*, 2020) quando a camada externa é constituída por tensioativos ou substâncias idênticas. (Dressaire *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2020) O revestimento pode ainda ser usado como sistema de administração de fármacos e a sua composição qualitativa-quantitativa é um fator crucial para a obtenção de sistemas esféricos. A presença de um revestimento heterogéneo pode levar à formação de uma forma esférica imperfeita com menor estabilidade.

Geralmente, recorre-se a dois tipos de revestimento: revestimento flexível, baseado numa monocamada fosfolipídica pouco espessa e revestimento rígido, promovido pela encapsulação polimérica/proteica caracterizado por uma elevada espessura. A presença de uma camada externa sólida melhora a longevidade da nanoestrutura e previne os fenómenos de coalescência, por impedimento estérico, estabilizando melhor as bolhas contra a dissolução do que as monocamadas lipídicas. (Che e Theodorakis, 2017; Kooiman *et al.*, 2014)

A distribuição do tamanho das nanobolhas é também importante para a estabilidade a longo prazo da formulação. A existência de uma população de nanobolhas com diâmetro uniforme retarda, conseqüentemente, o amadurecimento de Ostwald. Gotículas de perfluorocarbono podem aumentar de tamanho, não só por coalescência, mas também por difusão molecular. A difusão molecular consiste na deslocação de moléculas de perfluorocarbono das gotículas mais pequenas para as gotículas maiores. (Ogawa *et al.*, 2018)

9.2.2. Influência do processo de fabrico

Os parâmetros do processo temperatura de pré-aquecimento, tempo e intensidade de sonicação desempenham também um papel na estabilidade da formulação. Independentemente da temperatura da formulação antes da sonicação (temperatura pré-aquecimento), verificou-se que a sonicação por 3 minutos induz um aumento de temperatura de cerca de 5°C. Este aspeto torna-se particularmente relevante em formulações com constituintes proteicos, uma vez que temperaturas elevadas podem danificar a estrutura tridimensional da proteína. (Rovers *et al.*, 2016)

9.2.3. Influência das condições ambientais e de armazenamento

Se a tensão superficial da camada externa da bolha for elevada, a bolha é facilmente destruída. Nesse sentido, a adição de um tensoativo é crucial para diminuir a tensão superficial da bolha. O potencial zeta pode indiretamente estimar a carga superficial, sendo usado como um indicador de estabilidade por determinar o potencial elétrico ou capacidade de interação entre as NBs e outras bolhas ou partículas. A estabilidade depende do tipo de partículas a analisar, mas geralmente considera-se estável quando o valor absoluto do potencial zeta é igual ou superior a 30mV. (Journal *et al.*, 2019)

À medida que a carga superficial se aproxima de zero, a possibilidade de fusão de bolhas aumenta. Assim, bolhas com uma carga superficial neutra são pouco estáveis e agregam facilmente. (Ogawa *et al.*, 2018)

Bolhas com cargas superficiais são estabilizadas pela repulsão eletrostática entre as bolhas, evitando-se a agregação e coalescência das NBs. Quando o pH diminui, aumenta a acidez (aumento da concentração de iões de hidrogénio), o que conduz ao aumento do potencial zeta. Ao contrário, em condições básicas (aumenta a concentração de iões hidróxido) o potencial zeta é tendencialmente negativo.

A adição de eletrólitos, por exemplo NaCl, afeta benéficamente o potencial zeta da bolha, evita a dispersão do gás nuclear e a fusão de bolhas, contribuindo para o aumento da estabilidade das bolhas. (Thi Phan *et al.*, 2020)

Para que uma bolha permaneça intacta, a pressão no interior e exterior da bolha deve ser equilibrada. Aumentando a pressão externa, o tamanho da bolha diminui e aumenta a solubilidade do solvente no núcleo gasoso, ocorrendo a dissolução da bolha. O aumento da pressão ambiental pode ter efeitos diferentes consoante o tipo de revestimento da bolha. Se a camada externa for composta por proteínas, e, portanto, mais rígida, verifica-se uma deformação da estrutura, enquanto que quando a camada externa é composta por lípidos, é

altamente elástica e, portanto, consegue-se alguma resistência à perda do gás. (Rovers *et al.*, 2015)

A temperatura é o fator chave para a estabilidade das bolhas. Quando a temperatura aumenta, o gás do núcleo expande-se de acordo com a lei dos gases ideais. Assim, à medida que a temperatura do solvente circundante aumenta, a bolha expande e a tensão elástica aplicada à membrana externa também aumenta. (Park *et al.*, 2020) Bolhas armazenadas a 4 °C são mais estáveis (até 1 mês) do que aquelas armazenadas em temperaturas entre os 20 a 25°C após preparação. (Rovers *et al.*, 2016) Por ter melhor estabilidade, as bolhas são muitas vezes armazenadas na forma liofilizada, sendo diluídas com água aquando da sua utilização, e apresentando uma durabilidade aproximada de um ano. (Chauhan *et al.*, 2014)

10. DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÃO PARA A PREPARAÇÃO DE NANOBOLHAS

O principal desafio na temática das nanobolhas é identificar estratégias de formulação que permitam aumentar o tempo de circulação das bolhas, possibilitando a sua chegada a tecidos específicos, sem afetar a sua ecogenicidade.

Para garantir que se formam duas partes diferenciadas da nanobolha, o núcleo e a camada externa, diferentes compostos com propriedades físico-químicas distintas integram a formulação de nanobolhas.

As nanobolhas podem ser pré-formuladas na forma de nanogotículas que encapsulam um núcleo de perfluorocarbono ou perfluoropentano estabilizado por albumina, lípidos ou polímeros. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013) Os núcleos têm baixa solubilidade aquosa e não são tóxicos em pequenas doses. Além disso, devido ao elevado peso molecular, baixa tensão superficial e ponto de ebulição baixo, permitem que as nanogotículas permaneçam no estado líquido à temperatura corporal e tenham capacidade de extravasar o endotélio e atingir o espaço perivascular. (Zullino *et al.*, 2018)

Além do agente terapêutico, fármaco ou ácido nucleico, são também necessários excipientes como tensoativos (Tween[®] 20 e alginato de sódio), polímeros e co-tensoativos (Span 60 e poloxamer 188). A escolha do fármaco, do tensoativo e do co-tensoativo varia em função do local alvo e do modo de administração do fármaco. Deve ainda ter-se em conta que a concentração do polímero é a principal condicionante do tamanho da nanobolha ou nanogotícula. Polímeros como (poli(ácido láctico-co-glicólico), quitosano e copolímero de fosfolípidos (policaprolactona) são muito usados na formulação.

Nanobolhas são muitas vezes constituídas por fosfolípidos como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, os principais componentes da membrana celular, para reduzir a

possibilidade de mudança de fase¹³ quando as bolhas estão em condições fisiológicas ou de armazenamento. (Liu *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2020) Outros fosfolípidos utilizados são, por exemplo dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) ou dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC).

Uma estratégia para melhorar a resistência das bolhas baseadas em fosfolípidos em monocamada é adicionar polímeros às formulações. O PEG é um polímero flexível e hidrofílico que tem sido incorporado em várias composições de lípidos, polímeros e proteínas, juntamente com os seus diversos derivados na preparação de micro e nanobolhas. A PEGilação melhora a biocompatibilidade e contribui para aumentar a vida útil das nanobolhas porque evita a coalescência e constitui uma barreira física a vários agentes enzimáticos e previne a fagocitose por macrófagos do sistema imunitário. (Hettiarachchi *et al.*, 2007) É também um meio de incorporar grupos funcionais nas camadas de nanobolhas. A proporção dos componentes do PEG é fundamental para a preparação das nanobolhas, pois determina os tamanhos e características destas partículas. (Drugs.com, 2021; Khan *et al.*, 2019)

A policaprolactona (PCL) pode ser utilizada na forma de copolímero PEG-PCL para estabilizar a bolha e permitir a libertação do fármaco no local alvo, sob a ação de US. O PEG-PCL foi usado para a formação de nanogotículas carregadas com curcumina. A interação hidrofóbica entre a curcumina e o copolímero PEG-PCL permitiu uma eficiência de encapsulação da curcumina na ordem dos 95%. (Shende e Jain, 2019)

A polivinilpirrolidona (PVP) pode também ser adicionada à formulação para aumentar a estabilidade das nanobolhas ou para proporcionar um aumento de viscosidade. (Drugs.com, 2021) As soluções de PVP podem também ser usadas como agente de revestimento devido à sua segurança e longa aplicabilidade biomédica e farmacêutica.

Outra estratégia consiste na formulação de bolhas de perfluorocarbono, usando Pluronic como excipiente de controlo de tamanho. (Cheng *et al.*, 2019) Pluronic, também conhecido como poloxâmero, é um polímero anfifílico, não tóxico. Está classificado pela *Food and Drug Administration* (FDA) como excipiente inativo e é constituído por unidades de óxido de etileno-óxido de propileno-óxido de etileno, formando um copolímero tribloco não iónico. (Krupka *et al.*, 2010) A adição de Pluronic à formulação vai contrariar a perda de estabilidade devido à redução de tamanho, uma vez que causa uma diminuição da tensão superficial da bolha.

¹³ A temperatura de transição de fase é a temperatura à qual aumenta a fluidez dos fosfolípidos, passando de um estado gelificado para um estado líquido. Varia em função do grupo de cabeça polar, do grau de saturação das cadeias de hidrocarbonetos e dos comprimentos das cadeias carbonadas. (Khan *et al.*, 2019)

As nanobolhas devem ser preparadas acima das temperaturas de transição de fase para que se consiga uma composição homogénea. Todavia, de modo a minimizar a difusão do composto gasoso do núcleo, devem ser armazenadas abaixo das temperaturas de transição de fase após a preparação. (Khan *et al.*, 2019)

Dependendo do peso molecular do Pluronic, da sua hidrofobicidade e do comprimento do bloco, este polímero, combinado com tensoativos, pode melhorar a estabilidade das nanobolhas e controlar o seu tamanho: o tamanho da bolha diminui, devido a interações entre Pluronic-lípido, à medida que a concentração de Pluronic aumenta. Modifica também a fluidez e curvatura do invólucro lipídico e altera a elasticidade e o empacotamento do invólucro da bolha. É de notar que uma mudança na fluidez pode controlar a resposta ressonante das bolhas à irradiação com US, aumentando assim a ecogenicidade da bolha. A estabilidade superior das nanobolhas *in vitro* pode ser atribuída às interações estabilizadoras dos segmentos de poli (óxido de propileno) do tensoativo Pluronic com o gás hidrofóbico, bem como ao segmento de poli (óxido de etileno) protetor de superfície. (Krupka *et al.*, 2010; Uenette *et al.*, 2013)

O poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um polímero biocompatível e biodegradável, muito utilizado no encapsulamento de fármacos hidrofóbicos. O PLGA promove, comprovadamente a libertação prolongada do fármaco. Um exemplo dessa aplicação é a formulação de nanobolhas de acetato de nafarrelina¹⁴ encapsuladas com PLGA cuja libertação *in vitro* foi aumentada cerca de 20h. (Shende e Jain, 2019)

Na presença de um eletrólito (NaCl, por exemplo), em baixa concentração, o potencial zeta aumenta, os iões são adsorvidos na superfície das bolhas, formando uma fina camada elétrica (do inglês, *Electric Double Layer*, EDL) que impede a eluição do gás do núcleo e, portanto, aumenta a estabilidade das bolhas até cerca de uma semana. (Thi Phan *et al.*, 2020) É também relevante o efeito que evita que as bolhas se fundam devido à presença da mesma carga superficial nas bolhas (forças de repulsão entre bolhas). No entanto, uma elevada concentração do eletrólito anula a carga da EDL e reduz a estabilidade da bolha, acelerando o seu desaparecimento. (Uchida *et al.*, 2016)

II. APLICAÇÕES DAS NANOBOLHAS COMO ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA

II.1. Administração de fármacos através da barreira hematoencefálica

A barreira hematoencefálica (BHE) é uma barreira fisiológica, semipermeável e seletiva que separa o sangue circulante do fluido extracelular no sistema nervoso central (SNC). A BHE apresenta células endoteliais com junções de oclusão e vários transportadores (nomeadamente, transportadores de efluxo) que permitem manter a homeostase cerebral,

¹⁴ A nafarrelina é um agonista sintético potente da hormona libertadora das gonadotrofinas usado no tratamento de puberdade precoce central (puberdade precoce dependente de gonadotrofinas) e endometriose. É comercializado sob o nome Synare[®], um medicamento de administração nasal. (Pfizer Medical Information)

movimentar iões e moléculas e proteger o cérebro de toxinas, patogénios, inflamação, lesões e doenças.

A BHE é impermeável à grande maioria dos fármacos com mais de 400 Da administrados sistemicamente, excluindo-os *a priori* do sistema nervoso central (SNC). Deste modo, a administração eficiente de agentes terapêuticos diretamente no cérebro para tratar tumores cerebrais ou doenças neurodegenerativas fica significativamente limitada.

Atualmente, o único método capaz de permeabilizar localmente a BHE de forma não invasiva e transitória é a combinação de microbolhas com US. Este método apresenta um bom perfil de segurança e tem permitido a administração de um amplo espectro de moléculas terapêuticas, nomeadamente agentes quimioterapêuticos, fármacos para imunoterapia, vetores virais para terapia génica e células estaminais. Por serem menores que as microbolhas, as nanobolhas conseguem alcançar com maior concentração áreas do tecido encefálico onde as microbolhas teriam acesso limitado. Assim, em comparação com as microbolhas, a quantidade de nanobolhas administrada seria menor, para o mesmo efeito terapêutico. Não obstante, verificou-se que uma maior concentração de nanobolhas permite a maior persistência de US, uma vez que a cada pulso de US, uma porção de bolhas é danificada. Têm sido usadas nanobolhas de octafluoropropano (C_3F_8) com camada externa lipídica (DBPC, DPPA, DPPE), incorporando também Pluronic, uma vez que a cadeia de polietilenoglicol e o polímero Pluronic na superfície da bolha diminuem a absorção das nanopartículas pelos macrófagos e a estabilidade da nanobolha é aumentada quando são usados lípidos de longa cadeia. (Cheng *et al.*, 2019)

11.2. Administração de oxigénio

A hipoxia tecidual, fornecimento insuficiente de oxigénio aos tecidos, está relacionada com o aparecimento de várias condições médicas, como diabetes, queimaduras, escaras, feridas e doença oncológica. (Cavalli *et al.*, 2009, 2009; Cavalli, Soster e Argenziano, 2016)

Situações de hipoxemia grave são frequentemente tratadas com oxigénio inspirado, intubação e ventilação mecânicas; no entanto, se a reoxigenação adequada não for alcançada rapidamente, pode ocorrer paragem cardíaca, com lesões nos órgãos ou morte. (Fix, Borden e Dayton, 2015; McEwan *et al.*, 2015) Perdas de sangue acentuadas originam uma diminuição drástica no aporte sistémico de oxigénio. É então necessário restaurar, tão rapidamente quanto possível, o fornecimento de oxigénio aos tecidos. Para este propósito, podem ser utilizadas emulsões de perfluorocarbonos ou transportadores de oxigénio à base de hemoglobina que funcionam como sangue artificial. (Fix, Borden e Dayton, 2015)

Estima-se que pelo menos 50-60% dos tumores sólidos avançados contenham tecido em hipoxia, geralmente devido a irregularidades na microcirculação do tumor. A hipoxia tumoral leva a um mau prognóstico em doentes com cancro porque pode estar na origem de uma série de efeitos adversos, como resistência à quimioterapia e radioterapia, para além de aumentar o risco de desenvolvimento de metástases. (Fix, Borden e Dayton, 2015)

Bactérias anaeróbias crescem em ambientes isentos, ou quase isentos, de oxigénio e podem causar infeções em tecidos, como a pele, gengivas ou parede intestinal, danificados em consequência de cirurgia, lesão ou doença. O aporte direcionado de oxigénio pode ser um adjuvante útil na terapia antibiótica de infeções anaeróbicas.

Materiais com oxigénio na sua constituição podem funcionar como sistemas de administração específicos. (Cavalli *et al.*, 2009) Em contraste com os lipossomas de duas camadas de tamanho semelhante, as nanobolhas têm uma monocamada com um núcleo gasoso menos solúvel e, portanto, podem ser utilizadas na administração de gases. (Khan *et al.*, 2019) A abordagem focar-se-á apenas nas nanobolhas como sistemas de administração de oxigénio, por ser o tema base desta monografia.

Uma estratégia para a administração de oxigénio consistiu na formação de nanobolhas revestidas de sulfato de dextrano e núcleo de perfluoropentano, um gás pouco solúvel no qual o oxigénio é dissolvido e armazenado. Para melhorar a estabilidade da bolha foi ainda adicionada PVP à camada externa. Obtiveram-se bolhas esféricas com tamanho uniforme e carga superficial negativa suficiente de modo a evitar a agregação de várias nanobolhas. Este sistema tem boa capacidade para encapsular e armazenar oxigénio, não apresenta efeitos tóxicos em células Vero (células renais de macaco verde africano) nem atividade hemolítica em glóbulos vermelhos *in vitro*. (Cavalli *et al.*, 2009) Para a mesma composição nuclear, outro revestimento utilizado foi o quitosano, formando nanossistemas com camada externa de quitosano. Em ambas as composições, a frequência e o tempo de exposição aos US promoveu um aumento da cinética de libertação de oxigénio.

Em casos de hipoxia, doenças isquémicas, controlo de infeções e terapias oncológicas para melhorar a oxigenação sanguínea, pode ser perfundida uma solução salina com nanobolhas contendo oxigénio na sua composição de modo a gerar fluidos supersaturados deste gás.

Ao invés de perfluoropentano pode ser usado 2H,3H-decafluoropentano (DFP) como núcleo da bolha, originando nanotransportadores de oxigénio denominados de nanogotículas carregadas de oxigénio (do inglês, *oxygen-loaded nanodroplets*, OLND). Estas nanogotículas podem também ser revestidas de quitosano, polissacarídeo da camada externa de modo a diminuir a difusão do gás, ou por dextrano, tal como os nanossistemas anteriormente apresentados. OLND têm melhor capacidade de transporte e libertação de oxigénio do que

as nanobolhas com núcleo de perfluoropentano e não apresentam efeitos tóxicos sobre os queratinócitos humanos após internalização celular. (Prato *et al.*, 2015) Além disso, sabe-se ainda que o tratamento concomitante com US melhora ainda mais a administração transdérmica de oxigénio dos OLNDs.

A cicatrização de feridas crónicas¹⁵, problemas de saúde comuns com impacto significativo na qualidade de vida do doente, e de feridas hipóxicas, causadas pela rutura do tecido e oxigenação inadequada do leito da ferida podem ser promovidas por OLNDs. (Cavalli *et al.*, 2009; Prato *et al.*, 2015)

11.3. Administração de fármacos antineoplásicos

Em comparação com os tecidos normais, os tumores sólidos, particularmente, quando em hipoxia, apresentam características que impedem a ação de fármacos sobre o tumor, nomeadamente elevada angiogénese, pressão intercelular e divisão celular frequente. O tecido tumoral é ainda caracterizado pelo EPR¹⁶ que garante que moléculas de determinados tamanhos se acumulem preferencialmente no tecido tumoral comparativamente ao tecido normal. (Su *et al.*, 2021)

A terapia combinada é amplamente utilizada no tratamento quimioterapêutico de tumores. Todavia, a não seletividade ou não especificidade para células tumorais causa efeitos adversos significativos em tecidos e órgãos saudáveis, com risco de infeção generalizada, afetando o sucesso da maioria dos fármacos antineoplásicos. Além disso, a maioria destes fármacos apresenta um carácter hidrofóbico e baixa solubilidade aquosa que contribuem para o seu insucesso terapêutico. (Su *et al.*, 2021) A doxorrubicina, fármaco citotóxico que se intercala no ADN, e o paclitaxel, fármaco citotóxico que interfere com a tubulina, são exemplos de medicamentos utilizados frequentemente em esquemas de quimioterapia em associação com outros medicamentos citostáticos. (RCM Paclitaxel, 2010; RCM Doxorrubicina, 2010)

¹⁵ A pele humana é um órgão notavelmente plástico com grande capacidade de reparar feridas de forma rápida e eficaz. Apesar disso, os processos de cicatrização podem falhar quando, ao redor da ferida, existe um ambiente pró-inflamatório associado com hipóxia, aumento das proteases e carga bacteriana. Quando isto acontece, feridas vulgares podem tornar-se feridas crónicas, por exemplo, úlceras de pressão, queimaduras, vasculopatias associadas à diabetes, entre outras.

¹⁶ O efeito de maior permeabilidade e retenção (EPR) é um fenómeno exclusivo de tumores sólidos que se deve às diferenças anatómicas e fisiopatológicas entre os tecidos tumorais e os tecidos normais. Tecidos tumorais apresentam uma drenagem linfática deficitária (Fang, Nakamura e Maeda, 2011), mas uma grande densidade vascular (devido à angiogénese) em comparação com os tecidos normais. (Su *et al.*, 2021) Os vasos sanguíneos tumorais são normalmente constituídos por células endoteliais desalinhas e com grandes fenestrações, o que, juntamente com o pequeno tamanho das nanobolhas, facilita a sua penetração. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013) Todas estas características contribuem para um extravasamento seletivo e retenção de fármacos macromoleculares. (Fang, Nakamura e Maeda, 2011)

A estrutura versátil das nanobolhas tem sido explorada como modo de garantir uma administração direcionada de fármacos diferentes. (Fang, Nakamura e Maeda, 2011) Por serem suficientemente pequenas, as nanobolhas são capazes de penetrar nos tumores sólidos (infiltram-se no tumor), danificando o tecido tumoral. Consegue-se assim uma administração direcionada do fármaco, que permite reduzir a exposição aos tecidos não-alvo, saudáveis, minimizando os efeitos adversos sistêmicos e contribuindo para a redução das doses terapêuticas. As nanobolhas funcionam como nanotransportadores podendo acumular-se no interior dos tecidos tumorais por EPR ou por vetorização ativa pela presença de anticorpos na superfície da bolha. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013) Quando revestidas de fármacos antineoplásicos ou genes podem funcionar como plataforma de vetorização do agente terapêutico. (Jiang *et al.*, 2016)

Dos doentes diagnosticados com cancro da mama, 20 a 30% têm cancro da mama HER-2-positivo, que está associado a alguma resistência a agentes quimioterapêuticos e baixa sobrevida. Sabe-se também que a taxa de resposta para tumores que sobreexpressam HER-2 é melhorada ao combinar quimioterapia com a administração de trastuzumab (Herceptin[®]), um anticorpo monoclonal humanizado contra o receptor HER-2. Assim, foi projetado um sistema de nanobolhas de C₃F₈ com invólucro constituído por fosfolípidos ligados covalentemente a moléculas de Herceptin[®]. Estas nanobolhas são uma ferramenta para diagnóstico e avaliação da resposta ao tratamento do cancro da mama HER-2-positivo. Apresentam uma ligação muito específica a células tumorais, por reações de antígeno-anticorpo, penetrando no tecido tumoral e acumulando-se especialmente em tumores que expressam HER-2.

Para aumentar a sensibilidade das células e melhorar a eficácia da quimioterapia tumoral *in vivo* foram desenvolvidos alguns sistemas para vetorização destes fármacos. O primeiro, baseado na vaporização acústica de gota, compreende nanogotículas poliméricas de perfluorocarbono (perfluorpentano, por exemplo) estabilizadas com copolímero em bloco que se acumulam no tecido tumoral e sofrem, após aquecimento *in vivo*, conversão para micro ou nanobolhas. (Zhao *et al.*, 2013) Pela ação dos US aplicados na região tumoral, as nanobolhas carregadas de fármaco (doxorrubicina, paclitaxel, curcumina) cavitam e colapsam, libertando o fármaco encapsulado. No segundo, micelas poliméricas encapsulam PFP líquido e doxorrubicina e são transformadas em nanogotículas cujo invólucro é estabilizado com PEG. Como consequência do aumento da temperatura para 37°C, as nanogotículas vaporizam originando nanobolhas. (Gao *et al.*, 2008)

Foram ainda preparadas nanobolhas de perfluorocarbono e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) carregadas com metotrexato.

Um outro sistema resume-se à combinação de nanobolhas sensíveis aos US e péptidos promotores da penetração celular, aliando a capacidade de vetorização das nanobolhas, a penetração celular dos péptidos e a libertação de fármacos desencadeada por US a partir das nanobolhas. Este sistema foi explorado para distribuição de doxorubicina e camptotecina, um inibidor da topoisomerase I, tendo demonstrado grande atividade inibidora de tumor, aumentada pela estimulação por US. (Güvener *et al.*, 2017; Zullino *et al.*, 2018)

11.4. Terapia génica

A terapia génica consiste essencialmente na introdução de novo material genético no hospedeiro e apresenta-se como uma opção terapêutica promissora para o tratamento de patologias genéticas ou adquiridas. Na entrega de genes por administração sistémica é importante não apenas que as bolhas atinjam o tecido alvo e tenham efeitos físicos no tecido, mas também que a eficiência da administração do gene nas células-alvo seja aumentada. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020) Devido ao seu elevado tamanho, natureza hidrofílica e grupos fosfato carregados negativamente, os genes, não são eficientemente absorvidos pelas células. Além disso, são muito suscetíveis à degradação mediada por nucleases presentes no sangue. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013) Para superar essas limitações têm sido desenvolvidos vetores virais e não virais de administração de genes. Verificou-se que uma nanobolha pode funcionar não apenas como um agente de contraste de US, mas também como uma ferramenta de administração de pDNA ou siRNA¹⁷ com exposição aos US, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Suzuki *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2016)

No que concerne aos vetores não virais, mais especificamente micro e nanobolhas, a administração de ácidos nucleicos tem-se baseado essencialmente em duas estratégias: ou se administram concomitantemente ácidos nucleicos e microbolhas (ou seja, o agente de contraste) ou os ácidos nucleicos são carregados em sistemas de bolhas propositadamente construídos. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013; Cavalli, Soster e Argenziano, 2016) Pode ocorrer incorporação física direta de DNA na camada externa da bolha durante o processo de fabrico ou incorporação de lípidos catiónicos na camada externa que permitam ligar eletrostaticamente o DNA. O DNA pode também ser carregado em nanopartículas que se ligam covalentemente à bolha. A maioria destas formulações de bolhas demonstraram elevada capacidade de carregamento de DNA e/ou elevada eficiência de transfeção.

¹⁷ O pequeno RNA de interferência tem a capacidade de suprimir a expressão de oncogenes (por exemplo, c-myc) que estão intimamente relacionados com o crescimento, proliferação, invasão e expansão do tumor. Candidato potencial para o tratamento do cancro, o siRNA tem sido estudado quer por administração isolada como por administração na forma de conjugado com péptidos permeáveis às células. (Xie *et al.*, 2016)

Após a administração sistêmica da solução de ácidos nucleicos livres associada a microbolhas, verificou-se que os ácidos nucleicos desprotegidos foram rapidamente degradados e removidos da circulação, o que implica que quantidades extremamente elevadas de ácidos nucleicos sejam administradas. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

A formação de nanopartículas com polímeros catiónicos como polietilenoimina ou PLGA reduzem o risco de degradação por nucleases com consequente remoção da circulação, ao mesmo tempo que a carga positiva contribui para um aumento da interação com as membranas celulares e a absorção nas células. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

O carregamento de ácidos nucleicos (pDNA, siRNA e miRNA) na superfície de nanobolhas contendo lípidos catiónicos pode aumentar a estabilidade dos ácidos nucleicos. (Nomikou et al., 2012) Pode ser necessário ter em consideração os efeitos dos US sobre os ácidos nucleicos, dependendo da intensidade dos US e do tipo de moléculas apesar de ter verificado que não existia degradação do siRNA pela força física dos US usados para transfeção. É necessário ter em conta que nanobolhas catiónicas são mais instáveis que nanobolhas neutras e que os ácidos gordos de cadeia curta e insaturados aumentam a fluidez da membrana dos lipossomas, diminuindo a capacidade de retenção de gás. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020; Nomikou et al., 2012)

Para a administração direcionada de ácidos nucleicos com recurso a US, além da capacidade de carregamento das nanobolhas, é também relevante a sua capacidade de direcionamento. A presença de ligandos específicos para o local alvo aumenta a eficiência de administração. Um exemplo da aplicabilidade destas nanobolhas é a modificação de bolhas com anticorpos empregando péptido de ligação a Fc, derivados de proteínas A/G ou nanobolhas modificadas com anticorpo anti-CD146. Os péptidos que se ligam especificamente aos locais-alvo são também usados para a modificação de bolhas. Verificou-se que a capacidade de ligação pode ser aumentada combinando a cadeia longa de PEG de ligação de péptido e a cadeia curta de PEG sem péptido. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

A aplicação de US na presença de micro e nanobolhas pode aumentar a eficiência de transfeção, favorecendo a libertação de DNA nos tecidos alvo, diminuindo a transfeção nos tecidos nos quais não foi aplicado US. Quando combinadas com cavitação, frequências de US na faixa de 20–50 kHz são capazes de induzir dano ao tecido celular, verificando-se a administração de genes recorrendo a US para frequências de 1-3 MHz.

Ainda assim, a eficiência de transfeção é baixa em comparação com a eficiência de administração por vetores virais. A eficiência de transfeção usando como vetor bolhas carregadas de DNA varia entre 40-50%, enquanto que vetores virais conseguem eficiência de transfeção na ordem dos 100%. A fragilidade celular com consequente morte celular e a

presença de barreiras intracelulares ao redor do núcleo da célula impossibilita taxas de transfeção mais elevadas. Estima-se que apenas uma pequena porção do DNA que entra no citoplasma celular será capaz de atravessar a membrana nuclear. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013)

A investigação no campo dos nanossistemas está longe de estar concluída. Será necessário aumentar o carregamento de DNA, investigar a citotoxicidade e a biodistribuição destes sistemas e identificar outros critérios adequados (por exemplo, eficiência de transfeção e características do campo acústico) para que esta tecnologia tenha finalmente aplicabilidade clínica. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013; Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

Uma outra estratégia para a administração direcionada de ácidos nucleicos, genes por exemplo, é a criação de nanobolhas plasmónicas. A exposição transitória de nanopartículas de ouro a um pulso de laser curto conduz a um aumento de temperatura e, por um mecanismo de ressonância plasmónica, as nanobolhas de vapor são formadas à volta da nanopartícula plasmónica. As nanobolhas plasmónicas apresentam uma dupla ação mecânica e ótica ajustável e são sistemas capazes de administração vetorizada de genes a nível de uma única célula, o que pode ser usado para terapia genética segura e eficaz. (Cavalli, Bisazza e Lembo, 2013; Lukianova-Hleb *et al.*, 2011)

11.5. Teranóstica

A estrutura versátil das nanobolhas permite que quando combinadas com estímulos externos, possam ser exploradas não só para facilitar a administração de terapêutica, como também para possibilitar a obtenção de imagens de ressonância magnética, óticas, nucleares ou tomografia computadorizada. A teranóstica surge como forma de combinar diagnóstico e tratamento e é uma abordagem particularmente eficaz na melhoria do tratamento de patologias, como o cancro, quando num estadio inicial. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016; Janib, Moses e MacKay, 2010)

Tem sido explorada a combinação de US e nanobolhas formando um sistema teranóstico, tanto para diagnóstico quanto para administração de terapêutica. A ultrassonografia, usada frequentemente em ambientes hospitalares é uma ferramenta para deteção precoce e acompanhamento de doenças crónicas. Agentes de contraste na forma de micro ou nanobolhas podem ser usados simultaneamente para melhorar a resolução e a sensibilidade da imagem. Este sistema possibilita a obtenção de imagens dos tecidos patológicos ao mesmo tempo que monitoriza a cinética de distribuição e a biodisponibilidade de um fármaco.

Consegue-se assim, um ajuste de dose com consequente redução dos efeitos adversos, demonstrando benefício terapêutico. (Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

Idealmente, para fins teranósticos, o nanotransportador deve possuir elevada capacidade de carregamento, ser ajustável e estável, impedindo a libertação de fármaco fora do seu tecido biológico alvo. Um exemplo da utilização de nanobolhas como sistema teranóstico são as bolhas lipídicas carregadas com ácidos nucleicos e com capacidade aumentada de retenção de gás. Estas bolhas permitem a obtenção de imagens de US otimizadas, ao mesmo tempo que têm capacidade de transfeção. Importa mencionar também uma formulação à base de quitosano com fosfato de prednisolona e com um complexo paramagnético fixado no invólucro. Devido à carga superficial positiva, as nanobolhas interagiram com o complexo magnético carregado negativamente e a cinética de libertação de fosfato de prednisolona aumentou após exposição aos US. (Cavalli *et al.*, 2015)

Apesar de ser um sistema promissor, os bioefeitos da utilização repetida de US não são ainda conhecidos e, portanto, são necessárias mais informações de segurança para que se massifique a sua utilização. Conforme o progresso do desenvolvimento de formulações de nanobolhas, assim irá progredir também a combinação de bolhas e US, principalmente para diagnóstico e terapia de doenças associadas ao envelhecimento. (Cavalli, Soster e Argenziano, 2016; Endo-Takahashi e Negishi, 2020)

12. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As nanobolhas são pequenas cavidades cheias de gás com importância amplamente reconhecida pelo seu reduzido tamanho e por possuírem elevada estabilidade e relação superfície/volume. Estas propriedades são condicionadas não só pelas características da formulação, como também pelo processo de fabrico e garantem aplicações promissoras em várias vertentes da ciência.

A versatilidade estrutural das nanobolhas permite que agentes terapêuticos com vários pesos moleculares e propriedades físico-químicas distintas possam ser incorporadas dentro da estrutura das bolhas ou adsorvidas à sua superfície. As nanobolhas apresentam-se como um transportador eficiente, ao mesmo tempo que possuem especificidade elevada para o tecido alvo. São, portanto, uma estratégia para administração direcionada de agentes terapêuticos como fármacos, ácidos nucleicos ou oxigénio contribuindo para um aumento da eficácia terapêutica e para a minimização dos efeitos adversos.

Devido à sua segurança e baixo custo, os US têm sido utilizados juntamente com as nanobolhas como estímulo externo desencadeador da entrega do fármaco no local alvo. Facilitam a

penetração celular de compostos impermeáveis e melhoram a eficácia dos agentes terapêuticos e, portanto, são um método promissor para uma administração direcionada. Apesar de apelativa, para que exista uma aplicabilidade prática real desta tecnologia é necessário maior investimento na pesquisa e implementação de processos de fabrico de nanobolhas que garantam simultaneamente um elevado rendimento e um baixo custo de produção. São também necessários mais estudos, principalmente de nanotoxicologia, biocompatibilidade, biossegurança e sobre a estabilidade na corrente sanguínea e possíveis interações com proteínas plasmáticas.

13. PERSPETIVAS FUTURAS

Atualmente, a Universidade de Oxford tem a decorrer um ensaio clínico com o objetivo de comprovar se a presença de nanobolhas administradas por via oral tem efeito fisiológico na hipoxia articular. Sabe-se que pessoas com artrite reumatóide e artrite psoriática têm, habitualmente, baixos níveis de oxigénio e articulações inflamadas. Assim, pretende-se estudar se, quando ingeridas na forma líquida, as nanobolhas apresentam capacidade de entrar na corrente sanguínea e alterar o nível de oxigénio nas articulações. (University of Oxford, 2021) O RNS60 é um medicamento experimental com efeitos favoráveis em estudos pré-clínicos de neuroinflamação e neurodegeneração. Contém nanobolhas de oxigénio em solução salina de NaCl 0,9%. (Paganoni *et al.*, 2019) Devido à sua capacidade para inibir a expressão de moléculas pró-inflamatórias, apresenta-se como um candidato promissor a medicamento para tratamento da esclerose lateral amiotrófica (ELA), (Mario Negri Institute for Pharmacological Research, 2016) acidente vascular cerebral (AVC) isquémico, (Revalesio Corporation, 2021) e asma. (Revalesio Corporation, 2016)

O RNS60 mostrou ser bem tolerado num estudo piloto aberto em ELA e, portanto, o Instituto Mario Negri tem a decorrer um ensaio clínico de fase II com foco na avaliação do efeito do RNS60 nos biomarcadores da ELA e na progressão da doença. A ELA é uma doença neurodegenerativa caracterizada pela inflamação e pela perda de neurónios motores com consequente paralisia muscular progressiva, podendo causar morte entre três a cinco anos após o início dos sintomas. (Paganoni *et al.*, 2019) O RNS60 é administrado durante 24 semanas com recurso a duas vias de administração, cumulativamente: por via intravenosa uma vez por semana, e por via nasal, em nebulização matinal nos seis dias restantes de cada semana. (Mario Negri Institute for Pharmacological Research, 2016)

Estudos pré-clínicos sugerem fortemente que o RNS60 protege as células cerebrais após AVC, preservando o tecido cerebral viável e melhorando a recuperação funcional. Assim, a Revalesio Corporation iniciou um ensaio clínico de fase II para tentar mostrar os benefícios do RNS60,

administrado parenteralmente por infusão, no tratamento do AVC isquémico. (Revaesio Pipeline RNS60)

A hipoxia tecidual, está só por si relacionada com o aparecimento de patologias (Cavalli et al., 2009, 2009; Cavalli, Soster e Argenziano, 2016), favorecendo por sua vez o crescimento de bactérias anaeróbias que causam infeções nos tecidos que conduzem a lesões nos órgãos ou mesmo morte. (Fix, Borden e Dayton, 2015; McEwan et al., 2015) Assim, e com base nos estudos clínicos supracitados, o aporte direcionado de oxigénio parece ser um adjuvante útil na terapêutica de patologias como AVC ou ELA.

Ao serem bem-sucedidos, estes estudos demonstram a eficácia terapêutica e viabilidade da administração de nanobolhas *in vivo* em humanos, o que abre portas à utilização de nanobolhas como um possível sistema de administração direcionada de terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BULL, David S. *et al.* - Surface-Templated Nanobubbles Protect Proteins from Surface-Mediated Denaturation. **Journal of Physical Chemistry Letters**. . ISSN 19487185. 10:11 (2019) 2641–2647. doi: 10.1021/acs.jpcllett.9b00806.

BURGESS, Mark T.; PORTER, Tyrone M. - CONTROL OF ACOUSTIC CAVITATION FOR EFFICIENT SONOPORATION WITH. **Elsevier**. 45:3 (2019) 846–858. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.12.001.

CAPECE, Sabrina *et al.* - A general strategy for obtaining biodegradable polymer shelled microbubbles as theranostic devices. **Chemical Communications**. . ISSN 1364548X. 49:51 (2013) 5763–5765. doi: 10.1039/c3cc42037j.

CAVALLI, R. *et al.* - Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 03785173. 381:2 (2009) 160–165. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.07.010.

CAVALLI, R. *et al.* - Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. . ISSN 18734367. 129:2015) 39–46. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.03.023.

CAVALLI, Roberta *et al.* - Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 03785173. 378:1–2 (2009) 215–217. doi: 10.1016/j.ijpharm.2009.05.058.

CAVALLI, Roberta; BISAZZA, Agnese; LEMBO, David - Micro- and nanobubbles : A versatile non-viral platform for gene delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. . ISSN 0378-5173. 456:2 (2013) 437–445. doi: 10.1016/j.ijpharm.2013.08.041.

CAVALLI, Roberta; SOSTER, Marco; ARGENZIANO, Monica - Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery. **Ther. Deliv.** . ISSN 2041-5990. 7:2 (2016) 117–138.

CHAUHAN, Suvarcha *et al.* - Study of the effect of electrolyte and temperature on the critical micelle concentration of dodecyltrimethylammonium bromide in aqueous medium. **The Journal of Chemical Thermodynamics**. 78:2014) 175–181. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jct.2014.07.003>.

CHE, Zhizhao; THEODORAKIS, Panagiotis E. - Formation, dissolution and properties of surface nanobubbles. **Journal of Colloid and Interface Science**. . ISSN 10957103. 487:2017) 123–129. doi: 10.1016/j.jcis.2016.10.027.

CHENG, Bingbing *et al.* - Influence of Nanobubble Concentration on Blood-Brain Barrier

Opening Using Focused Ultrasound Under Real-Time Acoustic Feedback Control. **Elsevier**. 45:8 (2019) 2174–2187. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2019.03.016>.

CHOWDHURY, Sayan Mullick *et al.* - Ultrasound and microbubble mediated therapeutic delivery: Underlying mechanisms and future outlook. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 18734995. 326:2020) 75–90. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.06.008.

DRESSAIRE, Emilie *et al.* - Interfacial Polygonal Nanopatterning of Stable Microbubbles. 320:May (2008) 1198–1201.

DRUGS.COM - **Polyethylene Glycol (Inactive Ingredient)** [Consult. 1 ago. 2021]. Disponível em: <https://www.drugs.com/inactive/polyethylene-glycol-177.html>

DRUGS.COM - **Polyvinylpyrrolidone (Inactive Ingredient)** [Consult. 10 mai. 2021]. Disponível em <https://www.drugs.com/inactive/polyvinylpyrrolidone-271.html>

ENDO-TAKAHASHI, Yoko; NEGISHI, Yoichi - Microbubbles and nanobubbles with ultrasound for systemic gene delivery. **Pharmaceutics**. . ISSN 19994923. 12:10 (2020) 1–14. doi: 10.3390/pharmaceutics12100964.

EVA, Elena *et al.* - Development and characterization of new nanoscaled ultrasound active lipid dispersions as contrast agentes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. . ISSN 0939-6411. 77:3 (2011) 430–437. doi: 10.1016/j.ejpb.2010.12.007.

FAHY, Eoin *et al.* - Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**. . ISSN 00222275. 50:SUPPL. (2009) 9–14. doi: 10.1194/jlr.R800095-JLR200.

FAN MAOMING, TAO DANIEL, HONAKER RICK, LUO Zhenfu - Nanobubble generation and its application in froth flotation (part I): nanobubble generation and its effects on properties of microbubble and millimeter scale bubble solutions. **Elsevier**. 2010). doi: [https://doi.org/10.1016/S1674-5264\(09\)60154-X](https://doi.org/10.1016/S1674-5264(09)60154-X).

FANG, Jun; NAKAMURA, Hideaki; MAEDA, Hiroshi - The EPR effect : Unique features of tumor blood vessels for drug delivery , factors involved , and limitations and augmentation of the effect ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 0169-409X. 63:3 (2011) 136–151. doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009.

FIX, Samantha M.; BORDEN, Mark A.; DAYTON, Paul A. - Therapeutic gas delivery via microbubbles and liposomes. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 0168-3659. 209:2015) 139–149. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.04.027.

- GAO, Zhonggao *et al.* - Drug-loaded nano/microbubbles for combining ultrasonography and targeted chemotherapy. **Elsevier**. 48:2008). doi: 10.1016/j.ultras.2007.11.002.
- GEERS, Bart *et al.* - Crucial factors and emerging concepts in ultrasound-triggered drug delivery. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 164:3 (2012) 248–255. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.08.014.
- GROEN, Reinou S. *et al.* - Review : Indications for ultrasound use in low- and middle-income countries. 16:12 (2011) 1525–1535. doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02868.x.
- GÜVENER, Nihan *et al.* - Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro- and nanometer-sized formulations. **Methods**. . ISSN 10959130. 130:2017) 4–13. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.05.018.
- HERNANDEZ, Christopher *et al.* - Role of Surface Tension in Gas Nanobubble Stability Under Ultrasound. **ACS Applied Materials & Interfaces**. 2018). doi: 10.1021/acsami.7b19755.
- HETTIARACHCHI, Kanaka *et al.* - On-chip generation of microbubbles as a practical technology for manufacturing contrast agents for ultrasonic imaging. **Lab on a Chip**. . ISSN 14730189. 7:4 (2007) 463–468. doi: 10.1039/b701481n.
- INFARMED - Resumo das Características do Medicamento - Abraxane 5 mg/ml pó. . ISSN 1008-682X. 2010) 1–29.
- INFORMATIVO EMA - Resumo das Características do Medicamento - Myocet. . ISSN 1008-682X. 2010) 1–29.
- JANIB, Siti M.; MOSES, Ara S.; MACKAY, J. Andrew - Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 0169409X. 62:11 (2010) 1052–1063. doi: 10.1016/j.addr.2010.08.004.
- JIANG, Qiongchao *et al.* - Production and characterization of a novel long-acting Herceptin-targeted nanobubble contrast agent specific for Her-2-positive breast cancers. **Springer**. 2016). doi: 10.1007/s12282-014-0581-8.
- JOHAN, Unga *et al.* - Development and evaluation of stability and ultrasound response of DSPC-DPSG-based freeze-dried microbubbles. **Journal of Liposome Research**. . ISSN 0898-2104. 0:0 (2018) 000. doi: 10.1080/08982104.2018.1556294.
- JOHAN, Unga *et al.* - Scale-up production, characterization and toxicity of a freeze-dried lipid-stabilized microbubble formulation for ultrasound imaging and therapy. **Journal of Liposome Research**. . ISSN 0898-2104. 0:0 (2019) 000. doi: 10.1080/08982104.2019.1649282.

JOURNAL, An International *et al.* - In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal**. . ISSN 2169-1401. 47:1 (2019) 524–539. doi: 10.1080/21691401.2018.1561457.

KHAN, Muhammad Saad *et al.* - Surface composition and preparation method for oxygen nanobubbles for drug delivery and ultrasound imaging applications. **Nanomaterials**. . ISSN 20794991. 9:1 (2019) 4–9. doi: 10.3390/nano9010048.

KHODADADI DARBAN, A.; AHMADI, R. - Modeling and Optimization of Nano-bubble Generation Process Using Response Surface Methodology. **Int. J. Nanosci. Nanotechnol.** 9:3 (2013) 151–162.

KIM, Chulhong *et al.* - Multifunctional microbubbles and nanobubbles for photoacoustic and ultrasound imaging. **Journal of Biomedical Optics**. 15:February 2010 (2010) 13–15. doi: 10.1117/1.3302808.

KOOIMAN, Klazina *et al.* - Acoustic behavior of microbubbles and implications for drug delivery ☆. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 0169-409X. 2014) 1–21. doi: 10.1016/j.addr.2014.03.003.

KRAFFT, Marie Pierre; FAINERMAN, Valentin B.; MILLER, Reinhard - Modeling of the effect of fluorocarbon gases on the properties of phospholipid monolayers and the adsorption dynamics of their aqueous solutions or dispersions. **Springer. Colloid Po:2015**). doi: DOI 10.1007/s00396-015-3622-8.

KRAFFT, Marie Pierre; RIESS, Jean G. - Perfluorocarbons : Life Sciences and Biomedical Uses. **Journal of Polymer Science**. 45:2007) 1185–1198. doi: 10.1002/pola.21937.

KRUPKA, Tianyi M. *et al.* - Formulation and Characterization of Echogenic Lipid - Pluronic Nanobubbles. 216 (2010).

KWAN, James J.; BORDEN, Mark A. - Lipid monolayer collapse and microbubble stability. **Advances in Colloid and Interface Science**. . ISSN 00018686. 183–184:2012) 82–99. doi: 10.1016/j.cis.2012.08.005.

LEE, Jeong Yu *et al.* - Nanoparticle-Loaded Protein–Polymer Nanodroplets for Improved Stability and Conversion Efficiency in Ultrasound Imaging and Drug Delivery. **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim**. 2015). doi: 10.1002/adma.201502022.

LENTACKER, I. *et al.* - Understanding ultrasound induced sonoporation: Definitions and underlying mechanisms. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 18728294. 72:2014) 49–

64. doi: 10.1016/j.addr.2013.11.008.

LI, Jiaping *et al.* - Ultrasound-mediated diagnostic imaging and advanced treatment with multifunctional micro/nanobubbles. **Cancer Letters**. . ISSN 18727980. 475:January (2020) 92–98. doi: 10.1016/j.canlet.2020.01.028.

LIU, Jia *et al.* - Preparation and characterization of a novel silicon-modified nanobubble. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 12:5 (2017) 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0178031.

LUKIANOVA-HLEB, Ekaterina Y. *et al.* - Selective gene transfection of individual cells in vitro with plasmonic nanobubbles. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 01683659. 152:2 (2011) 286–293. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.02.006.

MARIO NEGRI INSTITUTE FOR PHARMACOLOGICAL RESEARCH - **The Effect of RNS60 on ALS Biomarkers - ClinicalTrials.gov** [Consult. 14 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03456882?term=nanobubbles&draw=2&rank=3>

MATTOON, John S.; NYLAND, Thomas G. - **Fundamentals of Diagnostic Ultrasound** Third Edit ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2014 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4160-4867-1.00001-5>>. ISBN 9780323242967

MCEWAN, Conor *et al.* - Oxygen Carrying Microbubbles for Enhanced Sonodynamic Therapy of Hypoxic Tumours. **Journal of Controlled Release**. . ISSN 0168-3659. 2015). doi: 10.1016/j.jconrel.2015.02.004.

MICHAILIDI, Elisavet D. *et al.* - **Fundamentals and applications of nanobubbles**. ISBN 9780128141786.

Device for Generating and Handling Nanobubbles. MITROPOULOS, Athanasios *et al.* 2016, EP2995369 A1 p. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/1b/a1/74/e35ab6b4446055/EP2995369A1.pdf>

NOMIKOU, Nikolitsa *et al.* - Studies on neutral, cationic and biotinylated cationic microbubbles in enhancing ultrasound-mediated gene delivery in vitro and in vivo. **Acta Biomaterialia**. . ISSN 1742-7061. 8:3 (2012) 1273–1280. doi: 10.1016/j.actbio.2011.09.010.

NUMMELA, Sirpa *et al.* - Sound transmission in archaic and modern whales: Anatomical adaptations for underwater hearing. **Anatomical Record**. . ISSN 19328486. 290:6 (2007) 716–733. doi: 10.1002/ar.20528.

OGAWA, Koichi *et al.* - High-resolution scanning electron microscopic evaluation of cell-membrane porosity by ultrasound. **Medical Electron Microscopy**. . ISSN 09184287. 34:4 (2001) 249–253. doi: 10.1007/s007950100022.

OGAWA, Koki *et al.* - Efficient gene transfection to the brain with ultrasound irradiation in mice using stabilized bubble lipopolyplexes prepared by the surface charge regulation method. **International Journal of Nanomedicine**. . ISSN 11782013. 13:2018) 2309–2320. doi: 10.2147/IJN.S157375.

PAGANONI, Sabrina *et al.* - A pilot trial of RNS60 in amyotrophic lateral sclerosis. **Muscle and Nerve**. . ISSN 10974598. 59:3 (2019) 303–308. doi: 10.1002/mus.26385.

PARK, Beomjin *et al.* - Stability of engineered micro or nanobubbles for biomedical applications. **Pharmaceutics**. . ISSN 19994923. 12:11 (2020) 1–12. doi: 10.3390/pharmaceutics12111089.

PEYMAN, Sally A. *et al.* - On-chip preparation of nanoscale contrast agents towards high-resolution ultrasound imaging. **Lab on a Chip**. . ISSN 14730189. 16:4 (2016) 679–687. doi: 10.1039/c5lc01394a.

PILLAI, R. *et al.* - A phospholipid-PEG2000 conjugate of a vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2)-targeting heterodimer peptide for contrast-enhanced ultrasound imaging of angiogenesis. **Bioconjugate Chemistry**. 2010). doi: 10.1021/bc9005688 Abstract.

PRATO, Mauro *et al.* - 2H,3H-decafluoropentane-based nanodroplets: New perspectives for oxygen delivery to hypoxic cutaneous tissues. **PLoS ONE**. . ISSN 19326203. 10:3 (2015) 1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0119769.

PRESSET, Antoine *et al.* - Endothelial Cells, First Target of Drug Delivery Using Microbubble-Assisted Ultrasound. **Ultrasound in Medicine and Biology**. . ISSN 1879291X. 46:7 (2020) 1565–1583. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2020.03.013.

Protocolo de Dispensa Exclusiva em Farmácia - Cloridrato de pseudoefedrina + Cloridrato de triprolidina (60 mg + 2,5 mg) - 2017).

PULSIPHER, Katherine W. *et al.* - Engineering Theranostic Microbubbles Using Microfluidics for Ultrasound Imaging and Therapy: A Review. **Elsevier**. 2018). doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2018.07.026.

RCM PANTELMIN - Resumo das Características do Medicamento - Pantelmin. 2016) 5–48.

REVALESIO CORPORATION - **Effect of RNS60 on the Late Phase Asthmatic Response to Allergen Challenge - ClinicalTrials.gov** [Consult. 9 jun. 2021]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02422121?cond=RNS60&draw=2&rank=6>

REVALESIO CORPORATION - **Safety of RNS60 in Large Vessel Occlusion Stroke Patients Undergoing Endovascular Thrombectomy - ClinicalTrials.gov** [Consult. 1

ago. 2021]. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04693715?cond=RNS60&draw=2&rank=10>

Realesio Pipeline RNS60 - [Consult. 15 ago. 2021]. Disponível em: <https://realesio.com/pipeline/>

ROSSI, Simona; WATON, Gilles; KRAFFT, Marie Pierre - Effects of Perfluorocarbon Gases on the Size and Stability Characteristics of Phospholipid-Coated Microbubbles: Osmotic Effect versus Interfacial Film Stabilization. 2012).

ROVERS, Tijs A. M. *et al.* - Effect of Temperature and Pressure on the Stability of Protein Microbubbles. 2015). doi: 10.1021/acsami.5b08527.

ROVERS, Tijs A. M. *et al.* - Temperature is key to yield and stability of BSA stabilized microbubbles. **Food Hydrocolloids**. . ISSN 0268005X. 52:2016) 106–115. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.05.038.

SEMAT, Henry; KATZ, Robert - **Physics, Chapter 9: Hydrodynamics (Fluids in Motion)** Disponível em: <http://digitalcommons.unl.edu/physicskatz%0Ahttp://digitalcommons.unl.edu/physicskatz>

SHENDE, Pravin; JAIN, Sajal - Polymeric nanodroplets: an emerging trend in gaseous delivery system. **Journal of Drug Targeting**. . ISSN 10292330. 27:10 (2019) 1035–1045. doi: 10.1080/1061186X.2019.1588281.

SIRSI, Shashank R.; BORDEN, Mark A. - State-of-the-art materials for ultrasound-triggered drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. . ISSN 18728294. 72:2014) 3–14. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.010.

STRIDE, Eleanor; EDIRISINGHE, Mohan - Novel microbubble preparation technologies. **Soft Matter**. . ISSN 1744683X. 4:12 (2008) 2350–2359. doi: 10.1039/b809517p.

SU, Chunhong *et al.* - Current advances in ultrasound-combined nanobubbles for cancer-targeted therapy: a review of the current status and future perspectives. **RCS Advances**. 2021). doi: <https://doi.org/10.1039/D0RA08727K>.

SUZUKI, Ryo *et al.* - Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. 125:2008) 137–144. doi: 10.1016/j.jconrel.2007.08.025.

SYNAREL® Indications and Usage (nafarelin acetate) | Pfizer Medical Information - US - [Consult. 12 mai. 2021]. Disponível em: <https://www.pfizermedicalinformation.com/en-us/synarel/indications-usage>

- TEZEL, Ahmet; MITRAGOTRI, Samir - Interactions of Inertial Cavitation Bubbles with Stratum Corneum Lipid Bilayers during Low-Frequency Sonophoresis. **Biophysical Journal**. . ISSN 00063495. 85:6 (2003) 3502–3512. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74770-5.
- THI PHAN, Khanh Kim *et al.* - Nanobubbles: Fundamental characteristics and applications in food processing. **Trends in Food Science and Technology**. . ISSN 09242244. 95:2020) 118–130. doi: 10.1016/j.tifs.2019.11.019.
- TINKOV, Steliyan *et al.* - Microbubbles as Ultrasound Triggered Drug Carriers. **Wiley InterScience**. 2008). doi: 10.1002/jps.21571.
- UCHIDA, Tsutomu *et al.* - Effect of NaCl on the Lifetime of Micro- and Nanobubbles. **MDPI**. 2016) 1–10. doi: 10.3390/nano6020031.
- UENETTE, G. Illes G. *et al.* - Acoustic Characterization And Pharmacokinetic Analyses Of New Nanobubble Ultrasound Contrast Agents. 39:11 (2013) 2137–2146. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2013.05.007.
- UNIVERSITY OF OXFORD - **An investigation of whether orally delivered nanobubbles have a physiological effect on joint hypoxia?** - **ClinicalTrials.gov** [Consult. 14 jun. 2021]. Disponível em: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04844008?term=nanobubbles&draw=2&rank=1>
- WANG, Shiyong *et al.* - Production rate and diameter analysis of spherical monodisperse microbubbles from two-dimensional, expanding-nozzle flow-focusing microfluidic devices. **Biomicrofluidics**. 2013). doi: 10.1063/1.4774069.
- XIE, Xiangyang *et al.* - Cell-penetrating peptide-siRNA conjugate loaded YSA-modified nanobubbles for ultrasound triggered siRNA delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. . ISSN 18734367. 136:2015) 641–650. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.10.004.
- XIE, Xiangyang *et al.* - Efficient siRNA delivery using novel cell-penetrating peptide-siRNA conjugate-loaded nanobubbles and ultrasound. 42:6 (2016) 1362–1374. doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2016.01.017.
- XING, Zhanwen *et al.* - The fabrication of novel nanobubble ultrasound contrast agent for potential tumor imaging. **Nanotechnology**. . ISSN 09574484. 21:14 (2010). doi: 10.1088/0957-4484/21/14/145607.
- YAN, Fei *et al.* - A Lipopeptide-Based $\alpha\beta_3$ Integrin-Targeted Ultrasound Contrast Agent for Molecular Imaging of Tumor Angiogenesis. **Ultrasound in Medicine and Biology**. 2015). doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2015.05.023.

ZHAO, Ying-Zheng *et al.* - Potential and problems in ultrasound-responsive drug delivery systems. **International Journal of Nanomedicine**. 2013). doi: <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S43589>.

ZULLINO, Sara *et al.* - From Micro- to Nano-Multifunctional Theranostic Platform: Effective Ultrasound Imaging Is Not Just a Matter of Scale. **Molecular Imaging**. . ISSN 15360121. 17:2018). doi: 10.1177/1536012118778216.

ANEXOS

I. CERTIFICADO DE FORMAÇÃO DA GAMA LACTACYD®



CERTIFICADO DE FORMAÇÃO

O presente documento atesta que o profissional de saúde

Andreia Daniela Matos Aleixo

recebeu formação da Perrigo Portugal na área/no(s) produto(s)

Lactacyd – Higiene Intima

no dia

14 Abr 21

com a duração de

60 min

Vitor Silveira

Vitor Silveira
Medical Sales & Training Manager



Lagoas Park – Edifício 15, Piso 3
2740-262 Porto Salvo - Portugal



www.perrigo.pt
chcipientinfo@perrigo.com



T +351 214 167 610
F +351 214 167 619

2. REGISTO DE PRESENCAS E SUMÁRIOS DAS FORMAÇÕES ASSISTIDAS ENQUANTO ESTAGIÁRIA NA FARMÁCIA SERRANO



Registo de Presenças e Sumários

Acção: Alergias

Data: 29/3/2021 Local: Farmácia
 Horário: Das 16 às 17 Horas

Sumário:
Alergias

Entidade Formadora: SANOFI
 Formador: Helena Nunes

Nome dos Participantes	Rubrica
<u>De Jane</u>	<u>AR</u>
<u>Lúcia</u>	<u>AR</u>
<u>Isma</u>	<u>AR</u>
<u>Sofia</u>	<u>AR</u>
<u>Carla</u>	<u>AR</u>
<u>Isabela</u>	<u>AR</u>
<u>Carla</u>	<u>AR</u>
<u>Andreia</u>	<u>AR</u>

Acção: Produtos Aboca

Data: 1/04/2021 Local: Farmácia
 Horário: Das 19:30 às 21:30 Horas

Sumário:
Apresentação produtos
usos (Colher, Colhas)
Água de Limão

Entidade Formadora: Phytoderm
 Formador: Helena

Nome dos Participantes	Rubrica
<u>De Jane</u>	<u>AR</u>
<u>Lúcia</u>	<u>AR</u>
<u>Carla</u>	<u>AR</u>
<u>Isma</u>	<u>AR</u>
<u>Sofia</u>	<u>AR</u>
<u>Carla</u>	<u>AR</u>
<u>Isabela</u>	<u>AR</u>
<u>Andreia</u>	<u>AR</u>

Acção: Produtos ISDIN

Data: 22/4/2021 Local: Farmácia
 Horário: Das 17 às 18 Horas

Sumário:
Apresentação produtos de diferentes
linhas ISDIN (pele atópica, solares,
higiene sucocentária, Avana, Urea,
baby, ...)

Entidade Formadora: Farmácia
 Formador: Andreia Aleixo (Esteticiana)

Nome dos Participantes	Rubrica
<u>Catarina Andreia</u>	<u>AR</u>
<u>Lúcia</u>	<u>AR</u>
<u>Isma Cavalho</u>	<u>AR</u>
<u>Isma</u>	<u>AR</u>
<u>Sofia</u>	<u>AR</u>

Acção: _____

Data: ___/___/___ Local: _____
 Horário: Das ___ às ___ Horas

Sumário: _____

Entidade Formadora: _____
 Formador: _____

Nome dos Participantes	Rubrica