

# **Validação de um Imunossensor para Diagnóstico de Infecção por Citomegalovírus**

## **Experiência Profissionalizante na Vertente de Farmácia Comunitária e Investigação**

**Paula Cristina Barbosa de Sousa Soares**

Relatório para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Farmacêuticas**  
(Mestrado Integrado)

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Mendes Dias Cabral  
Co-orientador: Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Lurdes Paiva Monteiro

**Março de 2021**



# Dedicatória

*Ao meu marido, Vítor*

*Aos meus filhos, Rodrigo e Henrique*

*À certeza de que nenhum sonho tem “prazo de validade”*



# Agradecimentos

Quando, em 2010, iniciei este percurso, sabia que iria enfrentar muitas dificuldades, que teria muitos obstáculos para ultrapassar e muitas etapas para vencer. Sabia que não seria possível sem ajuda, que não conseguiria sozinha. Agora que está a chegar ao fim, é a hora de agradecer a todos quantos tornaram este sonho possível, a todos os que sonharam comigo, que choraram comigo, que celebraram comigo... Não é minha esta vitória, é nossa.

O meu agradecimento vai, em primeiro lugar, para a Universidade da Beira Interior, instituição que me recebeu e me proporcionou todas as condições para uma primeira licenciatura em Química Industrial e agora o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. E porque as instituições são os profissionais que nelas trabalham, o meu agradecimento vai também para todos os Professores e pessoal não docente com quem tive o privilégio de me cruzar e que tanto contribuíram para a minha formação e enriquecimento pessoal.

Agradeço ao Laboratório de Análises Clínicas da Covilhã, S.A. e ao grupo SYNLAB, empresa onde desempenhei funções até maio de 2020 e, de uma forma muito especial, às minhas colegas de trabalho – Lurdes, Cláudia, Marta e Sara – companheiras de tantas lutas e que nunca deixaram de acreditar em mim e me desafiavam todos os dias a chegar mais além, que estiveram sempre ao meu lado nesta luta e que muitas vezes acreditaram mais em mim do que eu própria. Muito OBRIGADA!

Agradeço também à farmácia São João, na pessoa da sua Diretora Técnica, Dr<sup>a</sup> Dina Esteves, pela forma acolhedora como me receberam, pela compreensão em relação ao meu estatuto de trabalhador-estudante, que condicionava os horários do estágio, pelo tempo que me dedicaram e por todo o apoio e ensinamentos transmitidos.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Cristina Mendes Dias Cabral, agradeço a competência na orientação, a disponibilidade, o saber, o carinho e a amizade, mas, acima de tudo, a paciência e a compreensão ao longo destes anos que teimavam em se multiplicar.

À minha co-orientadora, Prof.<sup>a</sup> Doutora Maria de Lurdes Paiva Monteiro, agradeço o tempo generosamente cedido, o profissionalismo e a dedicação, mesmo quando

cansada e desgastada pela sua luta diária na linha da frente contra o Covid, e por acreditar e tentar manter-me positiva quando tudo parecia estar errado.

Agradeço também à Prof.<sup>a</sup> Doutora Luiza Granadeiro, diretora do curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, que sempre me incentivou e acompanhou o meu percurso com interesse e disponibilidade.

Aos colegas de curso, que me acompanharam e ajudaram, agradeço o respeito e a consideração que sempre tiveram por mim e o contributo para o meu percurso pessoal e académico. Uma palavra especial para as amigas Sandra Almeida, Marta Oliveira, Carina Tomás, Cristiana Borrego, Mélanie e Bohdana, que me fizeram acreditar ser possível, que estavam sempre lá para me animar e com quem tanto aprendi.

Aos amigos Cristina e Pedro, grandes impulsionadores da minha candidatura a este curso, agradeço todas as palavras de apoio, todos os gestos de amizade, a presença nos momentos chave, as alegrias e as partilhas de tantas vivências, ao longo desta caminhada a que chamamos vida.

Quero ainda agradecer a um grupo de pessoas especiais, com quem tenho a honra de trabalhar atualmente, e que conheci nesta reta final, num ano completamente atípico, marcado por uma pandemia e no qual iniciei um processo de profunda mudança a nível profissional, que todos os dias me faz ver que a mudança nem sempre é má, só temos que estar atentos e procurar algo bom no meio da adversidade, fizeram-me “renascer” e voltar a acreditar. Obrigada, Marília, Ana Raquel, Micaela, Roberta, Rita, Margarida e Ana pelo carinho e motivação. Obrigada, Professora Sílvia Socorro por conduzir este barco, por me ter proporcionado uma experiência tão enriquecedora e pelo empurrão final para a conclusão deste projeto.

Por fim, com a certeza de que não encontrarei palavras suficientes porque todas serão poucas, agradeço à minha família, o pilar da minha existência. Eles que embarcaram comigo nesta aventura, que se sacrificaram, que se preocuparam, que me apoiaram incondicionalmente. Eles que me viram rir e chorar, que tantas vezes assistiram ao meu desespero e outras tantas à minha confiança, que me viram querer desistir e continuar a lutar. Eles que nunca desistiram, que continuaram a confiar, sem nunca lamentar ou cobrar, sempre convictos, sempre presentes, sempre atentos, sempre companheiros. OBRIGADA, Vítor! OBRIGADA, Rodrigo! OBRIGADA, Henrique!

# Resumo

A presente dissertação apresenta, no Capítulo 1, o trabalho desenvolvido na componente de Investigação e, no Capítulo 2, os conhecimentos e competências adquiridos durante o estágio em Farmácia Comunitária, realizado na Farmácia São João, Covilhã, e pretende ser o trabalho final para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Citomegalovírus é um vírus DNA de cadeia dupla, o maior e o mais complexo vírus da família *Herpesviridae* sendo considerado um dos agentes infecciosos mais perigosos em indivíduos imunocomprometidos, no recém-nascido e na mulher grávida. Constitui a principal causa de infeção congénita provocando malformações no feto e recém-nascido e constituindo um problema de saúde pública. Após a infeção primária o vírus tem a capacidade de permanecer no organismo do hospedeiro de forma latente, reativando depois sem razão aparente específica e podendo causar manifestações clínicas sintomáticas e recorrentes.

O diagnóstico da infeção por CMV é feito por técnicas virológicas e moleculares para deteção direta da presença do vírus, ou por metodologias serológicas que detetam uma resposta imune específica do hospedeiro. No entanto, os métodos de diagnóstico disponíveis são, muitas vezes, complexos, demorados e dispendiosos, dificultando a sua utilização em larga escala e como métodos de rastreio. Torna-se, então, importante o desenvolvimento de um método rápido e eficiente, de baixo custo e com a possibilidade de adaptação a sistemas de “point-of-care”, que permita o diagnóstico da infeção por CMV, e uma abordagem efetiva para a prevenção e tratamento das doenças associadas.

Nesse sentido, um grupo de investigação da UBI desenvolveu um imunossensor eletroquímico descartável, cujo princípio de funcionamento é um imunoensaio do tipo mpEIA “sandwich” utilizando anticorpos específicos contra a glicoproteína B de CMV.

No trabalho de investigação apresentado no capítulo 1, pretende-se iniciar a segunda fase de validação do imunossensor, avaliando a sua aplicabilidade a amostras biológicas. As amostras biológicas utilizadas foram previamente analisadas em laboratório clínico para pesquisa de DNA de CMV por RT-PCR, sendo conhecido o resultado relativamente à presença ou ausência de CMV. O ensaio experimental realizado foi a metodologia mpEIA “sandwich”, que está na base de desenvolvimento do imunossensor. Os resultados obtidos permitem esboçar valores de “cut-off”, sensibilidade e especificidade para a técnica.

A farmácia Comunitária, pela sua fácil acessibilidade à população em geral e pela formação e qualificação dos seus colaboradores, é um local privilegiado para a prestação de cuidados de saúde contribuindo, de uma forma ativa, para a melhoria da qualidade de vida das populações que servem. O Farmacêutico Comunitário é um profissional de saúde dotado de conhecimentos técnico-científicos que lhe permitem estabelecer a ligação medicamento-utente de forma responsável e profissional, intervindo ativamente na sensibilização para o uso correto e racional dos medicamentos e outros produtos de saúde, assegurando a sua eficácia e segurança, e garantindo a máxima qualidade em todos os serviços que presta.

Por forma a permitir que o farmacêutico comunitário desempenhe com rigor e qualidade as suas funções, a farmácia deve possuir uma estrutura adequada tanto ao nível das instalações e equipamentos como no que diz respeito aos recursos humanos e científicos, sistema informático e fontes de informação. Disso se dará conta no Capítulo 2, bem como das atividades desenvolvidas e dos conhecimentos e competências adquiridos no decurso do estágio em farmácia comunitária.

## **Palavras-chave**

Citomegalovírus, Imunoensaio, mpEIA, ELISA, Farmácia Comunitária, Farmacêutico

# Abstract

This dissertation presents, in Chapter 1, the work developed at the research component and, in Chapter 2, the knowledge and skills acquired during the internship in Community Pharmacy held at Farmácia São João, Covilhã, and intends to be the final work to obtain the Master's degree in Pharmaceutical Sciences.

Cytomegalovirus is a double-stranded DNA virus, being the largest and most complex virus of the *Herpesviridae* family and is considered one of the most dangerous infectious agents in immunocompromised individuals, newborns and pregnant women. It is the main cause of congenital infection causing malformations in the fetus and newborn constituting a public health problem. After primary infection, the virus has the ability to remain in the host organism latently, reactivating afterwards for no apparent specific reason and causing symptomatic and recurrent clinical manifestations.

The diagnosis of CMV infection is made by virological and molecular techniques for the direct detection of virus presence, or by serological methodologies that detect a specific host immune response. However, the diagnostic methods available are often complex, time-consuming and expensive, making it difficult to use on a large scale and as screening methods. It is therefore important to develop a fast and efficient, low-cost method with the possibility of adapting to point-of-care systems, which allows the diagnosis of CMV infection, and an effective approach to the prevention and treatment of diseases associated with CMV.

In this sense, a research group from UBI developed a disposable electrochemical immunosensor, operating under the principle of a sandwich mpEIA immunoassay using specific antibodies against CMV glycoprotein B.

In the present research work, it is intended to proceed to the second phase of validation of the immunosensor, evaluating its applicability to biological samples. The biological samples used were previously analyzed in a clinical laboratory to search for CMV DNA by RT-PCR, the result being known regarding the presence or absence of CMV. The experimental test carried out was the sandwich mpEIA methodology, which is the basis for the development of the immunosensor. The results obtained allow to determine cut-off values, sensitivity and specificity for the technique.

The Community Pharmacy, due to its easy accessibility to the general population and the training and qualification of its employees, is a privileged place for the provision of health care, actively contributing to the improvement of populations quality of life. The Community Pharmacist is an health professional with technical-scientific knowledge that allows him to establish the drug-user connection in a responsible and professional manner, actively intervening in raising awareness of the correct and rational use of medicines and other health products, ensuring their efficiency and safety, and guaranteeing maximum quality in all provided services.

In order to allow the community pharmacists to perform their functions with rigor and quality, the pharmacy must have an adequate structure both in terms of facilities and equipment and regarding to human and scientific resources, computer system and information sources. This will be explained in Chapter 2, as well as the activities developed, and the knowledge and skills acquired during the internship in community pharmacy.

## **Keywords**

Cytomegalovirus, Immunoassay, mpEIA, ELISA, Community Pharmacy, Pharmacist

# Índice

Capítulo 1 - Validação de um Imunossensor para Diagnóstico de Infecção por Citomegalovírus	1
1 Introdução	3
1.1 Vírus	3
1.2 A Família <i>Herpesviridae</i>	5
1.3 Citomegalovírus Humano	9
1.3.1 Estrutura	10
1.3.2 Replicação Viral	12
1.3.3 Patogênese e Mecanismos de Defesa do Hospedeiro	15
1.3.4 Vias de Transmissão	17
1.3.5 Epidemiologia	18
1.3.6 Prevenção	19
1.3.7 Diagnóstico	20
1.4 Imunoensaios	25
1.4.1 Imunofluorescência	25
1.4.2 Radio-Imunoensaios (RIA)	26
1.4.3 Imunoensaios Enzimáticos	27
1.4.3.1 ELISA Direto	29
1.4.3.2 ELISA Indireto	30
1.4.3.3 ELISA “Sandwich”	31
1.4.3.4 ELISA Competitivo	32
1.4.3.5 Imunoensaios Enzimáticos Baseados em Partículas Magnéticas	33
1.4.4 Outros Imunoensaios	34
1.4.4.1 Imunossensores	34
1.4.4.2 Imunossensores para Detecção de CMV	36
2 Objetivos	39
3 Materiais e Métodos	41
3.1 Estudo	41
3.2 Amostra	41
3.2.1 Ética e Confidencialidade	41
3.3 Reagentes	42
3.3.1 Anticorpos	42
3.3.1.1 Anticorpo Primário	42

3.3.1.2 Anticorpo Secundário	43
3.3.2 Partículas Magnéticas	43
3.3.3 Tampão Fosfato	43
3.3.4 Outros Reagentes	43
3.4 Equipamentos	44
3.5 Procedimento	47
3.5.1 Imobilização do Anticorpo Primário nas Partículas Magnéticas Funcionalizadas – Preparação do Complexo MBs-PrG-mAb1	47
3.5.2 Realização do Ensaio mpEIA	47
3.6 Metodologias	51
3.6.1 Cálculo de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo	51
3.6.2 Avaliação do “Cut-off” – Curva de ROC	53
4 Resultados e Discussão	55
4.1 Caracterização das Amostras Biológicas Utilizadas	55
4.2 Resultados Obtidos	57
4.3 Determinação do Valor de “Cut-off”	64
5 Conclusões e Perspetivas Futuras	69
6 Referências Bibliográficas	71
Capítulo 2 – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária (Farmácia São João – Covilhã)	81
1 Introdução	83
2 Caracterização da Farmácia	85
2.1 Organização	85
2.2 Localização	86
2.3 Horário de Funcionamento	86
2.4 Recursos Humanos	87
2.5 Espaço Físico	87
2.5.1 Espaço Exterior	87
2.5.2 Espaço Interior	88
2.5.2.1 Zona de Atendimento ao Público	89
2.5.2.2 Zona de Receção de Encomendas e de Armazenamento	90
2.5.2.3 Gabinetes de Atendimento Personalizado	92
2.5.2.4 Laboratório	93
2.5.2.5 Escritório	94
2.5.2.6 Instalações Sanitárias	94

2.5.2.7 Outras Área	94
2.6 Equipamentos de Apoio e Recursos Informáticos	95
3 Informação e Documentação Científica	97
4 Medicamentos e outros Produtos de Saúde	101
4.1 Definição de Conceitos e Regime Jurídico	101
4.2 Sistemas de Classificação dos Medicamentos	103
5 Aprovisionamento e Armazenamento	105
5.1 Encomendas	105
5.1.1 Realização de Encomendas	106
5.1.2 Receção, Conferência e Validação de Encomendas	107
5.1.3 Devolução de Produtos Rececionados	109
5.2 Armazenamento	110
5.3 Controlo de Prazos de Validade	110
5.4 Devoluções	111
6 Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento	113
6.1 Recolha e Transmissão de Informação	113
6.2 Princípios da Farmacovigilância	114
6.3 Reencaminhamento de Medicamentos Fora de Uso	115
7 Dispensa de Medicamentos e Outros Produtos de Saúde	117
7.1 Regimes de Participação	117
7.2 Protocolos	118
7.3 Dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica	119
7.4 Dispensa de Medicamentos Genéricos	121
7.5 Dispensa de Psicotrópicos e Estupefacientes	121
7.6 Dispensa de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica e Automedicação	122
7.7 Dispensa de Outros Produtos de Saúde	123
7.7.1 Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal	124
7.7.2 Produtos Dietéticos para Alimentação Especial	125
7.7.3 Produtos Dietéticos Infantis	125
7.7.4 Fitoterapia e Suplementos Nutricionais (Nutracêuticos)	126
7.7.5 Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário	128
7.7.6 Dispositivos Médicos	128
8 Outros Cuidados de Saúde Prestados na Farmácia	131
8.1 Parâmetros Antropométricos	131
8.2 Medição da Tensão Arterial	131
8.3 Medição de Parâmetros Bioquímicos Fisiológicos	133

8.4 Serviço de Distribuição Domiciliária	134
8.5 Administração de Injetáveis	135
8.6 Consultas e Serviços de Especialidade	135
9 Contabilidade e Gestão	137
9.1 Legislação Laboral no Contexto da Farmácia Comunitária	137
9.2 Processamento do Receituário e Faturação	137
9.3 Documentos Contabilísticos	139
9.4 Incidência Fiscal no Contexto da Farmácia Comunitária	140
9.5 Documentação Relativa a Psicotrópicos e Estupefacientes	140
10 Considerações Finais	141
11 Referências Bibliográficas	143
Apêndices	147
Anexos	169

# Lista de Figuras

<b>Figura 1.1</b> Representação da estrutura de um vírus da família <i>Herpesviridae</i>	5
<b>Figura 1.2</b> Representação da estrutura de Citomegalovírus	10
<b>Figura 1.3</b> Representação esquemática dos passos que constituem o Ciclo de Replicação Viral	13
<b>Figura 1.4</b> Ciclo infeccioso de Citomegalovírus	14
<b>Figura 1.5</b> Célula epitelial com uma inclusão intranuclear do tipo “olho de coruja”, característica de infecção por citomegalovírus	15
<b>Figura 1.6</b> Esquema da técnica de imunofluorescência direta e indireta	26
<b>Figura 1.7</b> Placa de poliestireno de 96 poços utilizada na realização de testes ELISA	29
<b>Figura 1.8</b> Representação esquemática da técnica ELISA direta	30
<b>Figura 1.9</b> Representação esquemática da técnica ELISA indireta	31
<b>Figura 1.10</b> Representação esquemática da técnica ELISA “sandwich”	32
<b>Figura 1.11</b> Representação esquemática da técnica ELISA competitiva	32
<b>Figura 1.12</b> Representação esquemática de um biossensor	35
<b>Figura 3.1</b> Espectrofotômetro de microplacas xMark, Bio-Rad	44
<b>Figura 3.2</b> Separador magnético de 6 posições para tubos Eppendorf de 1,5 mL	45
<b>Figura 3.3</b> Separador magnético para microplacas de 96 poços	45
<b>Figura 3.4</b> Termoagitador mecânico ThermoMixer, Eppendorf	46
<b>Figura 3.5</b> Microplaca de 96 poços adaptada ao separador magnético	48
<b>Figura 3.6</b> Representação esquemática do imunoenensaio experimental realizado - mpEIA “sandwich”	49
<b>Figura 3.7</b> Exemplos de curvas ROC para técnicas com diferente capacidade discriminativa	54
<b>Figura 4.1</b> Representação gráfica das absorvâncias das amostras obtidas por mpEIA nos ensaios 1 a 7 (amostras 1 a 19)	58
<b>Figura 4.2</b> Representação gráfica das absorvâncias das amostras obtidas por mpEIA no ensaio 8 (amostras 20 a 31)	59
<b>Figura 4.3</b> Representação gráfica das absorvâncias das amostras obtidas por mpEIA no ensaio 9 (amostras 32 a 54)	59
<b>Figura 4.4</b> Resultados de absorvância (nm) obtidos para as amostras negativas, considerando o produto biológico da amostra	63
<b>Figura 4.5</b> Representação gráfica da sensibilidade e da especificidade para cada valor de “cut-off” teórico definido	66
<b>Figura 4.6</b> Representação gráfica da curva ROC obtida para a determinação do valor de “cut-off” da técnica mpEIA utilizada na detecção de CMV	67



# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> Vírus DNA com importância para o Homem	4
<b>Tabela 1.2</b> Vírus RNA com importância para o Homem	4
<b>Tabela 1.3</b> Família <i>Herpesviridae</i>	7
<b>Tabela 1.4</b> Resumo de testes de diagnóstico para identificação de CMV	23
<b>Tabela 4.1</b> Caracterização das amostras utilizadas e resultado obtido para pesquisa de CMV pela técnica de referência RT-PCR	55
<b>Tabela 4.2</b> Caracterização das amostras utilizadas e resultado obtido para pesquisa de CMV pela técnica de referência RT-PCR (Continuação)	56
<b>Tabela 4.3</b> Resultados obtidos para a absorvância (nm) das amostras pela técnica mpEIA	57
<b>Tabela 4.4</b> Resultados obtidos para a absorvância (nm) das amostras pela técnica mpEIA após descontar o valor do branco do ensaio experimental	61
<b>Tabela 4.5</b> Resultados de absorvância (nm) obtidos para as amostras negativas considerando o produto biológico da amostra	62
<b>Tabela 4.6</b> Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,025 nm	64
<b>Tabela 4.7</b> Valores de “cut-off” teóricos definidos e correspondente sensibilidades e especificidades obtidas	65



## Lista de Acrónimos

Ab2-HRP	Anticorpo secundário anti-citomegalovírus marcado com peroxidase de rábano
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
ANF	Associação Nacional das Farmácias
ATC	Classificação ATC (“Anatomical Therapeutic Chemical”)
BSA	Albumina de soro bovino (“Bovine Serum Albumin”)
CCF	Centro de Conferência de Faturas
CCT	Contrato Coletivo de Trabalho
CDTC	Centro de Documentação Técnica e Científica do INFARMED
CEDIME	Centro de Informação do Medicamento da Associação Nacional das Farmácias
CIM	Centros de Informação sobre Medicamentos
CIMI	Centro de Informação do Medicamento e Produtos de Saúde do INFARMED
CMV	Citomegalovírus
DM	Dispositivos Médicos
DNA	Ácido desoxirribonucleico (“Deoxyribonucleic Acid”)
EBV	Vírus Epstein-Barr (“Epstein-Barr vírus”)
EIA	Imunoensaio enzimático (“Enzymatic Imuno-Assay”)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”)
HHV	Herpes vírus humano (“Human Herpesvirus”)
HHV-6	Herpes vírus humano 6 (“Human Herpesvirus 6”)
HHV-7	Herpes vírus humano 7 (“Human Herpesvirus 7”)
HHV-8	Herpes vírus humano 8 (“Human Herpesvirus 8”)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (“Human Immunodeficiency Virus”)
HRP	Enzima peroxidase de rábano (“Horseradish Peroxidase”)
HSV-1	Vírus Herpes simplex tipo 1 (“Herpes Simplex Virus 1”)
HSV-2	Vírus Herpes simplex tipo 2 (“Herpes Simplex Virus 2”)
ICTV	Comité internacional de taxonomia de vírus (“International Committee on Taxonomy of Viruses”)
IF	Imunofluorescência
INFARMED	Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P.

IRC	Imposto sobre o Rendimento de pessoas Coletivas
IRS	Imposto sobre o Rendimento de pessoas Singulares
IVA	Imposto sobre o Valor Acrescentado
mAb1	Anticorpo monoclonal primário anti-citomegalovírus
MBs	Partículas magnéticas (“Magnetic Beads”)
MBs-PrG	Partículas magnéticas funcionalizadas com proteína G
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica
mpEIA	Imunoensaio enzimático baseado em partículas magnéticas (“magnetic particle-based Enzyme ImmunoAssay”)
MPE	Medicação Psicotrópica e Estupefacientes
MSRM	Medicamentos Sujeitos a Receita Médica
MUV	Medicamentos de Uso Veterinário
NK	Células “Natural killer”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato (“Phosphate Buffered Saline”)
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia (“Polymerase Chain Reaction”)
PIC’s	Preços Impressos na Cartonagem
PrG	Proteína G
PT	Prontuário Terapêutico
PUV	Produtos de Uso Veterinário
PVF	Preço de Venda à Farmácia
PVP	Preço de Venda ao Público
RAM	Reação Adversa aos Medicamentos
RCM	Resumo das Características dos Medicamentos
RIA	Radio-Imunoensaio (“Radioimmunoassay”)
RNA	Ácido ribonucleico (“Ribonucleic Acid”)
ROC	“Receiving Operating Characteristic”
RT-PCR	PCR em tempo real (“Real Time PCR”)
SIMeG	Serviço de Informação sobre Medicamentos e Gravidez do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra
SNC	Sistema Nervoso Central
SNF	Sistema Nacional de Farmacovigilância
SNS	Sistema Nacional de Saúde
TMB	3,3’,5,5’-tetrametilbenzidina
UC’s	Unidades Curriculares
VZV	Vírus Varicela-zoster (“Varicella Zoster Virus”)

## **Capítulo 1**

# **Validação de um Imunossensor para Diagnóstico de Infecção por Citomegalovírus**



# 1. Introdução

## 1.1. Vírus

Vírus são agentes patogênicos transmissíveis, com uma organização acelular simples, capazes de infectar o ser humano, insetos e outros animais, plantas, bactérias e fungos, induzindo infecção viral. Possuem apenas um tipo de ácido nucleico – ácido ribonucleico, RNA, ou ácido desoxirribonucleico, DNA -, e só se reproduzem no interior de células vivas. Apesar da sua simplicidade, quando comparados com organismos celulares, os vírus são extremamente importantes e merecedores de muita atenção [1-4].

Em termos estruturais os vírus são constituídos por uma nucleocápside – um genoma de ácido nucleico (DNA ou RNA) rodeado por uma camada proteica a que se dá o nome de cápside. A cápside pode apresentar diferentes formas (icosaédrica, helicoidal, etc), as quais estão diretamente relacionadas com a complexidade do vírus. Alguns podem mesmo apresentar outras camadas (de hidratos de carbono, lípidos e proteínas) envolvendo a cápside – o envelope. Adicionalmente muitos vírus possuem glicoproteínas na sua superfície, que atuam como projeções de ligação ou como enzimas, cauda ou outras estruturas e ainda paredes com multicamadas a envolver o genoma de ácido nucleico [1, 3, 4].

A classificação dos vírus segue um sistema uniforme desenvolvido pelo “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV), mas a maior parte deles é conhecida pelo seu nome comum [1]. O ICTV divide os vírus em ordem, família, subfamília, género e espécie, de acordo com a sua morfologia (tipo de cápside, presença ou ausência de envelope), genoma (RNA ou DNA, cadeia simples ou dupla), modo de replicação, tipo de hospedeiro e doenças causadas. Dentro da subfamília distinguem-se diferentes géneros com base nas características imunológicas e na especificidade do hospedeiro [1, 2, 5].

As tabelas 1.1 e 1.2 mostram as seis famílias de vírus de DNA e as 14 famílias de vírus de RNA com importância clínica para o Homem.

**Tabela 1.1** Vírus DNA com importância para o Homem (Adaptado de referência [1])

	<b>Família</b>	<b>Vírus</b>
<b>D N A</b>	<i>Adenoviridae</i>	Adenovírus
	<i>Hepadnaviridae</i>	Vírus da Hepatite B
	<i>Herpesviridae</i>	Herpes simplex tipo 1 e tipo 2, Varicella-zoster, Citomegalovírus, Epstein-Barr, Herpes vírus 6, 7 e 8
	<i>Papovaviridae</i>	Papiloma humano, JC e BK polioma
	<i>Parvoviridae</i>	Parvovírus B-19
	<i>Poxviridae</i>	Varíola, Vaccinia, Vírus do Ectima contagioso (vírus ORF), Vírus do Molusco contagioso

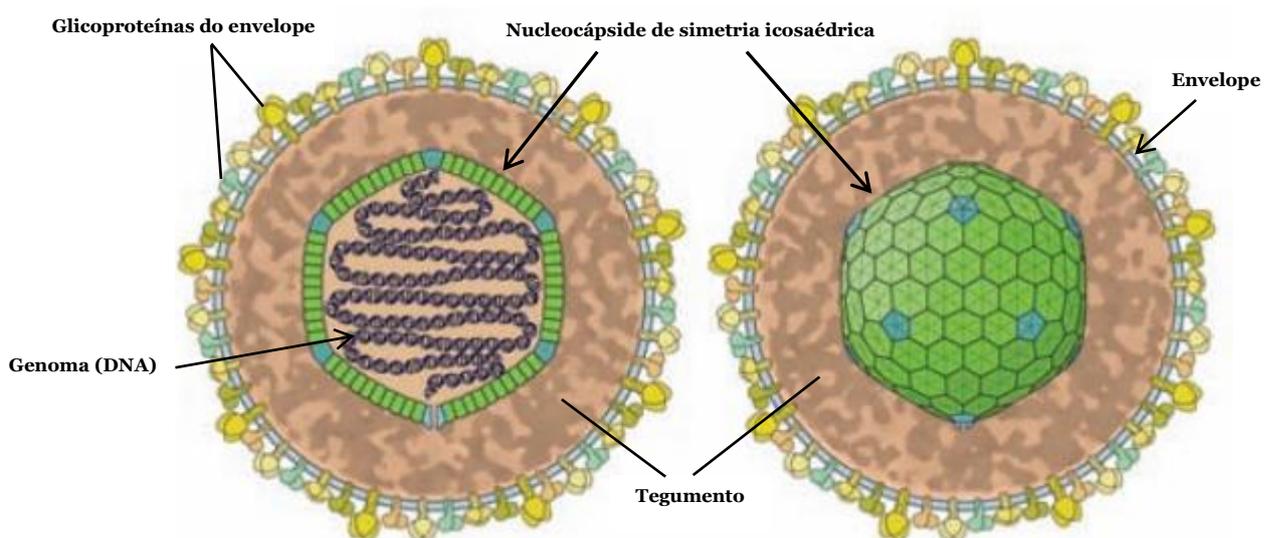
**Tabela 1.2** Vírus RNA com importância para o Homem (Adaptado de referência [1])

	<b>Família</b>	<b>Vírus</b>
<b>R N A</b>	<i>Arenaviridae</i>	Vírus da coriomeningite linfocitária, Vírus da febre de Lassa
	<i>Astroviridae</i>	Astrovírus causador de gastroenterite
	<i>Bunyaviridae</i>	Arbovírus incluindo Encefalite da Califórnia e La Crosse; Não-Arbovírus (incluindo relacionados com hantavírus)
	<i>Caliciviridae</i>	Vírus da Hepatite E e vírus tipo Norwalk
	<i>Coronaviridae</i>	Coronavírus
	<i>Filioviridae</i> <i>Flaviviridae</i>	Vírus do Ébola e da febre hemorrágica de Marburg. Arbovírus incluindo Febre Amarela, Dengue, Nilo Ocidental, Encefalite Japonesa, e Encefalite de Saint Louis; Não-Arbovírus incluindo hepatite C
	<i>Orthomyxoviridae</i> <i>Paramyxoviridae</i>	Influenza A, B e C Parainfluenza, Vírus da Parotidite, Vírus do Sarampo, Vírus Sincicial Respiratório
	<i>Picornaviridae</i>	Poliomielite, Coxsackie A, Coxsackie B, Echovírus, Enterovírus 68-71, Enterovírus 72 (hepatite A), Rinovírus
	<i>Reoviridae</i> <i>Retroviridae</i>	Rotavírus. Vírus da imunodeficiência humana (VIH-1 e VIH-2), Vírus Linfotrópico das Células T humanas (HTLV-1 e HTLV-2)
	<i>Rhabdoviridae</i> <i>Togaviridae</i>	Vírus da raiva, Vírus da encefalite equina de leste, de oeste e venezuelana, Vírus da rubéola

Não descorando a importância inegável que todos os vírus merecem, é dada uma maior atenção àqueles que afetam animais, em especial o Homem, e que são agentes causais de muitas doenças humanas, sendo eles os mais amplamente estudados. Neste contexto encontram-se os vírus da família *Herpesviridae*, em particular, os oito tipos de herpes vírus conhecidos como sendo patogênicos para o homem – herpes vírus humanos (HHV) [3, 6].

## 1.2. A Família *Herpesviridae*

A família *Herpesviridae* inclui mais de 100 vírus que afetam diversos vertebrados [4]. São vírus ubíquos, grandes e complexos, de DNA de cadeia dupla e cujas estruturas principais incluem a nucleocápside de simetria icosaédrica, o envelope formado por uma bi-camada lipídica e com glicoproteínas incorporadas, e o tegumento localizado entre o envelope e a nucleocápside e constituído por proteínas e enzimas (figura 1.1) [3, 4, 6]. Para além de apresentarem uma morfologia similar e algumas semelhanças nos ciclos de replicação, a principal característica comum aos vírus do grupo Herpes é a sua capacidade para, após a infeção primária, permanecerem no organismo do hospedeiro de forma latente, podendo alternar entre episódios de reativação e períodos de latência. As infeções causadas por estes vírus são, na sua maioria, benignas. No entanto, elas podem também tomar proporções mais severas e causar doença grave, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos, apresentando taxas de morbidade e mortalidade significativas [2, 7, 8].



**Figura 1.1** Representação da estrutura de um vírus da família *Herpesviridae* (Adaptado de referência [4])

Neste grupo são conhecidos oito vírus que afetam o Homem, herpes vírus humano, e que estão subdivididos em três subfamílias –  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -herpes vírus (tabela 1.3): herpes simplex tipo 1 e tipo 2 (HSV-1 e HSV-2) e varicella-zoster (VZV) da subfamília  $\alpha$ , citomegalovírus (CMV), herpesvírus 6 (HHV-6) e herpesvírus 7 (HHV-7) da subfamília  $\beta$ , Epstein-Barr (EBV) e herpesvírus 8 (HHV-8) da subfamília  $\gamma$  [1, 2, 4, 6, 8].

Pertencente à subfamília  $\beta$ -*Herpesvirinae*, o Citomegalovírus surge como um dos vírus mais prevalente da família *Herpesviridae* sendo considerado um importante agente patogénico causador de doença humana em grupos de risco específicos [9-11].

**Tabela 1.3** Família *Herpesviridae* (Adaptado das referências [1, 2, 6, 8, 12])

**Subfamília  $\alpha$ -Herpesvirinae**

Espécie	Nome Comum	Células-Alvo Primárias	Local de Latência	Transmissão	Patologias
HHV 1	Herpes Simplex tipo 1	Células do epitélio mucoso (predominantemente do trato oral)	Neurónios	Contacto Direto	HSV 1: Gengivostomatite, faringite, herpes labial, conjuntivite, ceratite, panarício herpético, encefalite (nos adultos) e doença disseminada
HHV 2	Herpes Simplex tipo 2	Células do epitélio mucoso (predominantemente do trato genital)	Neurónios	Contacto Direto (sexualmente transmissível)	
HHV 3	Varicella-zoster	Epitélio respiratório	Neurónios	Contacto próximo	HHV 3: varicela e zona

**Subfamília  $\beta$ -Herpesvirinae**

Espécie	Nome Comum	Células-Alvo Primárias	Local de Latência	Transmissão	Patologias
HHV 5	Citomegalovírus	Monócitos, linfócitos e células epiteliais	Monócitos, linfócitos, células epiteliais	Contacto próximo, transfusões, transplantes, materno-fetal	Citomegalovírus: infeção assintomática, infeção congénita no recém-nascido, doença sintomática em hospedeiros imunocomprometidos e mononucleose infecciosa heterofilo-negativa
HHV 6	Roseolovírus	Monócitos, linfócitos, células epiteliais e neurónios	Linfócitos T (CD4)	Saliva	
HHV 7	Roseolovírus	Monócitos, linfócitos e células epiteliais das glândulas salivares	Linfócitos T (CD4)	Saliva	HHV 6 e 7: roséola (exantema súbito), febre, mal-estar, erupção cutânea, leucopenia e pneumonia intersticial em doentes transplantados

**Subfamília  $\gamma$ -Herpesvirinae**

Espécie	Nome Comum	Células-Alvo Primárias	Local de Latência	Transmissão	Patologias
HHV 4	Epstein-Barr	Células epiteliais e linfócitos T ou B	Linfócitos B	Contacto próximo (saliva infetada)	EBV: mononucleose infecciosa (doença do beijo), doença linfocítica progressiva
HHV 8	Herpesvírus associado ao sarcoma de Kaposi	Linfócitos e outras células	Genoma viral das células tumorais de Kaposi, células endoteliais, células infiltrantes de tumor	Contacto próximo (sexual, saliva e outros)	



### 1.3. Citomegalovírus Humano

Citomegalovírus é o nome comum do herpes vírus 5, um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, subfamília  *$\beta$ -Herpesvirinae*, género Cytomegalovirus, espécie Herpes vírus Humano 5, de acordo com a classificação do ICTV [5, 13-15]. O seu nome tem origem no facto dos seus mecanismos de replicação intracelular conduzirem a um grande aumento do tamanho da célula, daí o prefixo “citomegalo” que significa “célula aumentada” [3].

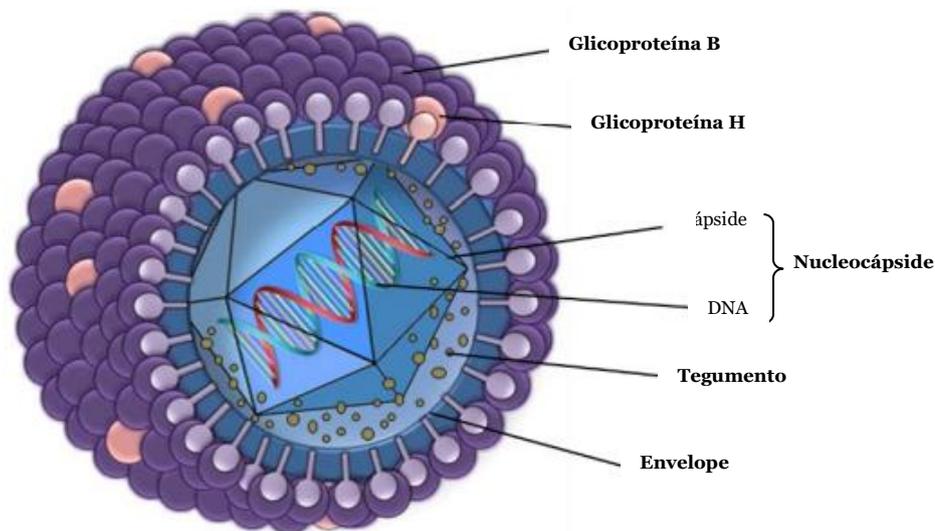
É o maior e o mais complexo vírus da família *Herpesviridae* e um importante agente patogénico humano, responsável por infeções geralmente assintomáticas em indivíduos imunocompetentes, mas que pode levar a complicações graves e doença severa em indivíduos imunocomprometidos (como sejam doentes transplantados ou transfundidos, HIV positivos, entre outros) e no recém-nascidos, sendo também a causa mais comum de infeção congénita viral conduzindo a malformações congénitas, atraso psicomotor e surdez. De facto, a infeção congénita causada por CMV é considerada um problema de saúde pública, com um peso muito significativo nos cuidados de saúde e nas economias mundiais [3, 6, 16-18].

Tal como os outros herpes vírus humanos, após a infeção primária, o citomegalovírus permanece no organismo do hospedeiro de forma latente, na qual as células infetadas não produzem novas partículas virais, mas retêm o genoma viral completo e a capacidade para, a qualquer momento, iniciar esse processo, dando origem ao aparecimento de infeções recorrentes (reativações e reinfeções). As infeções primárias nem sempre resultam em manifestações clínicas, exceto nos casos de infeção congénita, sendo a reativação do estado de latência para um processo de replicação ativa a principal causa de doença. Os mecanismos envolvidos no processo de reativação de CMV, e que surgem em determinadas situações de disfunção do sistema imunitário, não se encontram ainda totalmente identificados [13, 16, 19-23].

Atualmente o CMV continua a ser considerado como um dos agentes infecciosos mais perigosos em indivíduos imunocomprometidos, no recém-nascido e durante a gestação [15, 24, 25].

### 1.3.1. Estrutura

Estruturalmente, a partícula viral de CMV é em tudo semelhante à dos restantes herpes vírus. Como já referido, é o maior vírus desta família, com um diâmetro de aproximadamente 200 nm, e o mais complexo, sendo constituído por três estruturas principais (figura 1.2): a nucleocápside, que encerra o DNA de cadeia dupla linear no interior de uma cápside proteica, constituída por 162 capsómeros dispostos em simetria icosaédrica; o tegumento ou matriz, uma camada amorfa de proteínas que envolve a nucleocápside; e o envelope ou invólucro, uma bicamada fosfolipídica que incorpora um grande número de glicoproteínas virais que atuam como unidades de ligação e medidores da entrada do vírus na célula hospedeira [3, 13, 19, 26, 27].



**Figura 1.2** Representação da estrutura de Citomegalovírus (Adaptado de referência [12])

O genoma viral é constituído por uma dupla cadeia linear de DNA com mais de 230.000 pares de bases que codificam um grande número de proteínas estruturais e glicoproteínas. A quantidade de proteínas por ele codificadas e a complexidade das suas funções refletem o seu tamanho, o maior do grupo herpes e um dos maiores de todos os vírus causadores de doença humana [13, 18, 19, 28]. A estrutura genómica de CMV é do tipo E, composta por dois domínios invertidos: longo (L) e curto (S). Por sua vez, cada domínio apresenta uma região central única, “*unique long*” (UL) e “*unique short*” (US), delimitada por uma região repetitiva terminal, TRL e TRS, e por uma região repetitiva interna, IRL e IRS, respetivamente, resultando numa organização do tipo TRL-UL-IRL-IRS-US-TRS [13, 28]. Por recombinação entre as regiões repetitivas é possível alterar a

orientação de cada domínio único, resultando em quatro combinações diferentes, o que dá origem à coexistência de 4 isómeros genômicos diferentes entre a população viral infecciosa [19, 28].

A cápside proteica, que envolve o genoma, tem cerca de 100 nm de diâmetro, possui uma simetria icosaédrica e é formada por 162 subunidades repetitivas, os capsómeros. Das muitas proteínas virais encontradas no virião, as quatro principais que constituem a cápside são: “*major capsid protein*” (MCP) codificada pelo gene UL46, “*minor capsid protein*” (mCP) codificada pelo gene UL85, “*minor capsid binding protein*” (mCBP) codificada pelo gene UL46 e “*smallest capsid protein*” (SCP) codificada pelo gene UL48.5 [19, 29].

O tegumento é o espaço localizado entre a nucleocápside e o envelope e caracteriza-se por apresentar uma matriz amorfa e não estruturada e uma constituição rica em proteínas, reunindo em si quase metade das proteínas presentes na partícula viral de CMV. Sabe-se que a maior parte das proteínas que constituem o tegumento se encontra fosforilada, ainda que não se conheça totalmente a importância deste facto no desempenho das suas funções. Na verdade, pouco se sabe sobre a estrutura e funções do tegumento, mas as suas proteínas parecem estar envolvidas nos processos de maturação das partículas virais, de regulação e libertação do DNA viral ou de regulação de promotores virais e de alteração do metabolismo da célula hospedeira, desempenhando, assim, um papel importante na fase inicial da infeção [19, 30, 31].

A camada mais externa da partícula viral de CMV é o envelope. É através do envelope, e das suas unidades estruturais, que se estabelece a ligação com a célula hospedeira e posterior fusão para o seu interior. O envelope é constituído por uma bicamada fosfolipídica e incorpora um grande número de glicoproteínas virais que desempenham diferentes funções no desenrolar do processo infeccioso: elas atuam como mediadores e moduladores da entrada do vírus na célula hospedeira e na posterior libertação das novas partículas virais para o meio extracelular, facilitam a propagação célula-a-célula, influenciam o tropismo celular e interagem com a resposta do hospedeiro à infeção. Ainda assim, apenas 6 dessas glicoproteínas são reconhecidas como fundamentais no processo de replicação viral constituindo alvos para anticorpos neutralizantes: glicoproteína B, glicoproteína H, glicoproteína L, glicoproteína M, glicoproteína N e glicoproteína O. De entre estas merece destaque a glicoproteína B, ou gpUL55, por ser, de todas as glicoproteínas presentes na superfície do envelope, a mais abundante e aquela que demonstrou desempenhar um papel crucial no ciclo replicativo do vírus,

tendo-se tornado um pilar em muitos estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina efetiva contra CMV [19, 27, 32].

A glicoproteína B é uma proteína membranar do tipo 1, fortemente glicosilada, codificada na região genómica UL55 e que interage com o complexo glicoproteína H/glicoproteína L tendo uma ação fundamental na maquinaria que permite a ligação e fusão das partículas virais à célula hospedeira, processo essencial ao ciclo infeccioso. É a glicoproteína do envelope mais facilmente detetada em células infetadas, tendo sido demonstrado por diversos estudos que as ações levadas a cabo pelo sistema imunitário do hospedeiro, no sentido de neutralizar a atividade viral, são dirigidas contra a glicoproteína B [32-36]. No entanto, o facto de se encontrar fortemente glicosilada pode limitar o acesso dos anticorpos neutralizantes aos seus principais domínios funcionais [32].

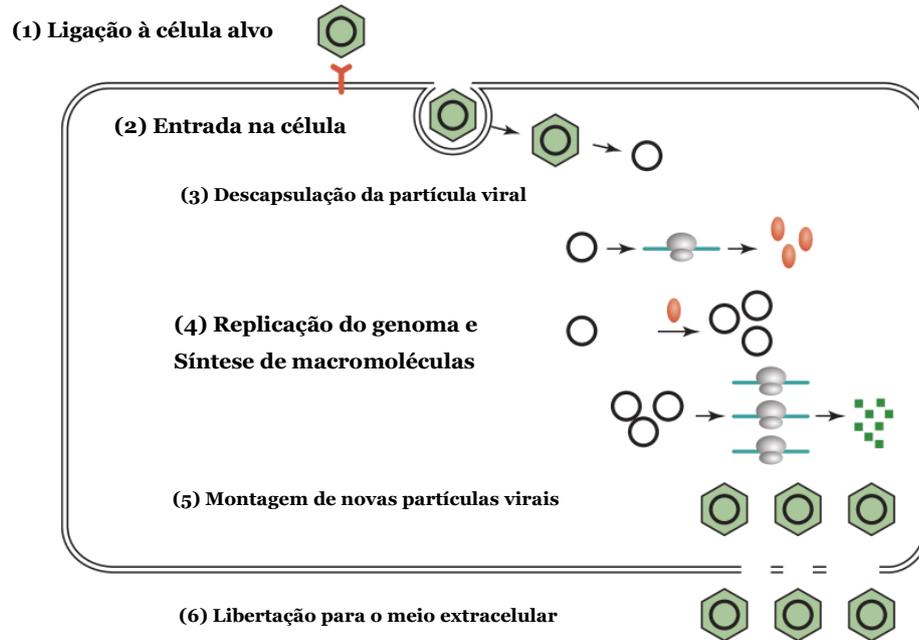
Durante o processo infeccioso agudo por CMV são gerados anticorpos específicos contra um grande número de proteínas, estruturais e não estruturais, mas apenas as glicoproteínas B e H induzem anticorpos capazes de neutralizar o vírus e eliminar células infetadas. Para além disso, a glicoproteína B é o antigénio dominante existente no envelope de CMV e aproximadamente 100% dos indivíduos infetados desenvolvem anticorpos contra esta proteína, o que a torna um componente promissor no desenvolvimento de testes de diagnóstico para CMV [15].

### **1.3.2. Replicação Viral**

De igual forma ao que acontece com todos os vírus, o CMV só se replica no interior da célula hospedeira, utilizando a maquinaria celular para a síntese dos componentes virais necessários à “construção” de novas partículas e sua libertação para o ambiente extracelular [1, 6].

Para qualquer vírus, o ciclo infeccioso (passos da replicação viral) inclui (figura 1.3) [1, 4, 19, 26]:

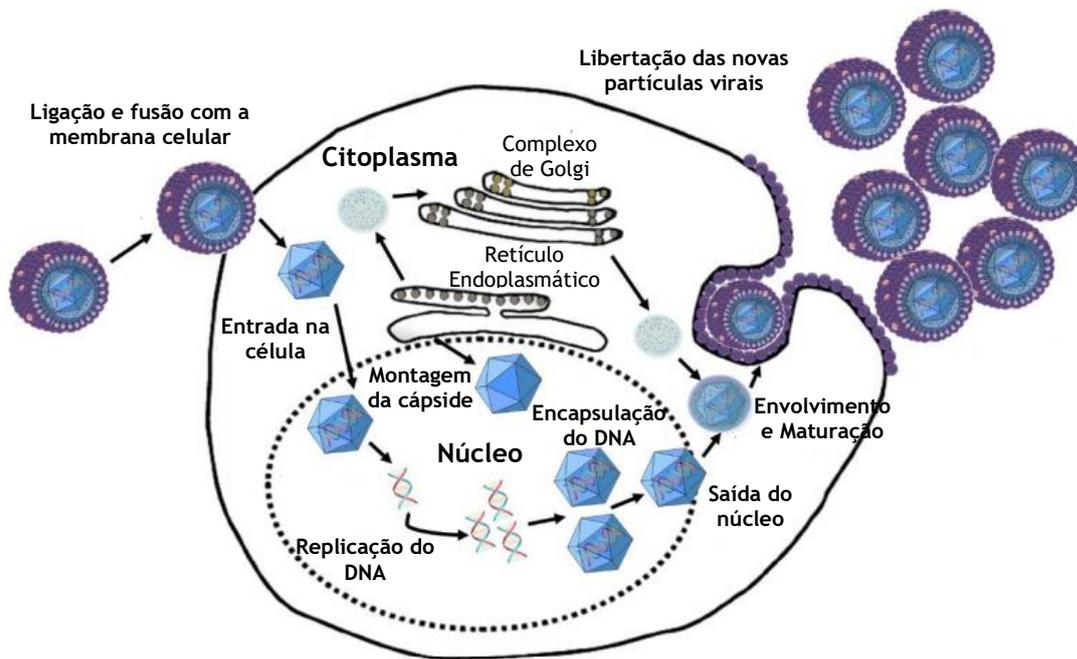
- 1 - Ligação à célula alvo (célula hospedeira);
- 2 - Penetração para o interior da célula;
- 3 - Descapsulação da partícula viral;
- 4 - Replicação do genoma e síntese de macromoléculas, utilizando a “maquinaria” da célula hospedeira;
- 5 - Montagem das novas partículas virais;
- 6 - Libertação para o ambiente extracelular.



**Figura 1.3** Representação esquemática dos passos que constituem o Ciclo de Replicação Viral (Adaptado de referência [4])

Na sua fase extracelular, uma partícula viral completa designa-se por virião, e não é capaz de se replicar, pois, apresenta poucas ou nenhuma enzimas [1, 3, 4]

Na fase intracelular, os vírus apresentam-se primeiramente como partículas de ácido nucleico com capacidade de replicação, que induzem o metabolismo da célula hospedeira a sintetizar componentes virais e vírus completos que são depois libertados para o ambiente extracelular, afetando outras células [3].

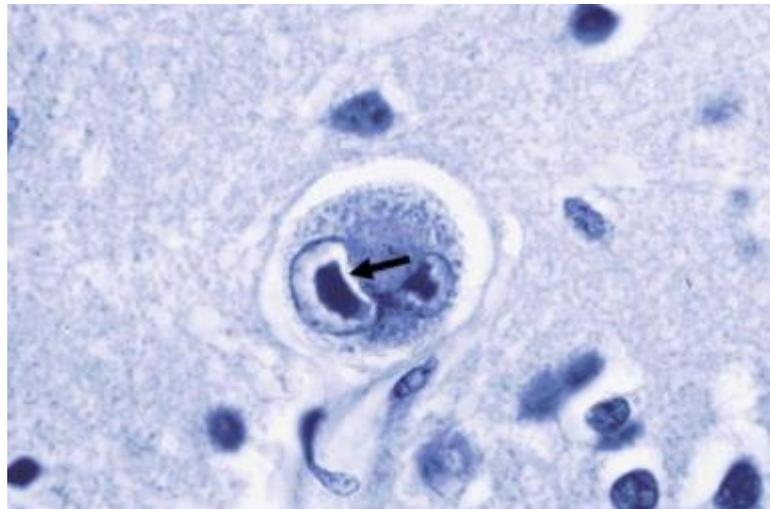


**Figura 1.4** Ciclo infeccioso de Citomegalovírus (Adaptado de referência [12])

Como referido, o primeiro passo da replicação viral é a ligação do vírus à membrana citoplasmática da célula-alvo. Esta ligação estabelece-se por intermédio das glicoproteínas do envelope de CMV, nomeadamente a glicoproteína B, e recetores específicos da membrana celular da célula hospedeira. Apenas um número limitado de tipos celulares se pode tornar hospedeiro para CMV, permitindo a infeção de determinados tecidos e não de outros [1]. A cascata de interações que ocorre neste processo culmina com a fusão do envelope do vírus com a membrana da célula permitindo a internalização da nucleocápside e das proteínas do tegumento. Numa segunda fase, e fazendo uso dos sistemas de transporte e translocação citoplasmáticos, a nucleocápside é encaminhada para o núcleo onde liberta o genoma viral, permitindo a síntese de novas partículas de DNA (replicação) (figura 1.4). É ainda no núcleo que se dá a formação das novas cápsides e a encapsulação do DNA viral originando as novas nucleocápsides. Estas novas nucleocápsides adquirem um primeiro invólucro ao atravessarem a membrana nuclear, sendo este removido durante a maturação viral, que ocorre no citoplasma e que inclui a aquisição do tegumento e do envelope final do vírus antes da sua saída da célula por um processo de exocitose (figura 1.4) [19, 27, 37-39].

### 1.3.3. Patogênese e Mecanismos de Defesas do Hospedeiro

Estudos histopatológicos e imunohistoquímicos indicam que a porta de entrada inicial de CMV no organismo humano é o epitélio dos tratos respiratório superior, gastrointestinal superior e urogenital. No entanto, e uma vez que a infecção é rapidamente estabelecida e o vírus facilmente disseminado, a afetação inicial de células epiteliais não parece ser essencial [19]. No feto, durante a gestação, a via de entrada e disseminação do vírus é hematogénica transplacentária [13]. O facto de se encontrarem alterações características nas células hospedeiras, provocadas pelos corpos de inclusão do tipo “olho de coruja” de CMV (figura 1.5), em tecidos como pulmões, pâncreas, rins e fígado, apoia a teoria de que qualquer órgão pode ser afetado [33, 40].



**Figura 1.5** Célula epitelial com uma inclusão intranuclear do tipo “olho de coruja”, característica de infecção por citomegalovírus (Retirado da referência [33])

Os leucócitos e o endotélio vascular parecem desempenhar um papel importante na disseminação do vírus no organismo infetado. Este processo infeccioso induz uma resposta imunitária humoral com a produção de anticorpos do tipo IgM, IgA e IgG e na qual está envolvida também a imunidade celular e as células “Natural killer” (NK) [13]. Os anticorpos do tipo IgM surgem no início de uma primoinfecção e permanecem por alguns meses, no entanto, em indivíduos imunocomprometidos, os seus níveis podem não chegar a valores detetáveis. Os anticorpos do tipo IgA chegam a ser detetáveis até um ano depois. Os anticorpos do tipo IgG, que também aparecem prontamente numa primoinfecção, mas mais tarde que os IgM, aumentam bastante durante o processo infeccioso e diminuem depois ligeiramente, mas permanecem presentes no organismo do hospedeiro até ao fim da sua vida, conferindo a chamada imunidade adquirida.

Estes anticorpos neutralizantes IgG dirigem-se principalmente às glicoproteínas B e H do envelope viral [13, 41].

A imunidade celular tem um papel crucial no controlo da infeção por CMV, principalmente por intervenção de linfócitos T CD8+ e CD4+. No entanto, em doentes transplantados, medicados com imunossuppressores, esta fração linfocitária está suprimida, estando também inibida em crianças com infeção congénita. Para além disso o genoma viral codifica um considerável número de componentes que lhe permitem “contornar” esta defesa do hospedeiro possibilitando a permanência de vírus em estado de latência e reativando numa grande variedade de células e tecidos [13, 42]. A expressão desses componentes virais suprime a função das células apresentadoras de antígenos limitando a ação dos linfócitos T. Da mesma forma, o mecanismo de atuação das células NK é afetado impedindo que estas reconheçam e destruam as células infetadas [6, 42, 43].

O tropismo celular de CMV apresenta três grupos principais de células:

- Células epiteliais, células endoteliais e fibroblastos, que são os alvos preferenciais sendo altamente suscetíveis à infeção por CMV;
- Leucócitos em circulação no sangue periférico, que são suscetíveis ao vírus;
- Células do parênquima especializadas, como neurónios, retina, células musculares e hepatócitos, que também podem ser infetadas conduzindo a uma citopatogenicidade significativa [44-46].

Não há uma certeza absoluta sobre quais os locais onde o vírus permanece durante os períodos de latência, mas uma vez que se encontra genoma viral em células como linfócitos, monócitos e granulócitos, embora nenhum destes tipos celulares seja permissivo ao desenvolvimento da infeção, é possível afirmar que, nestas células, o vírus é mantido num estado latente. Este facto é apoiado pela constatação de que os leucócitos podem transmitir infeção por CMV embora não contendo partículas virais ativas (importante via de transmissão no caso de transfusões sanguíneas que pode, no entanto, ser contornado pela remoção dos leucócitos do sangue do dador antes da transfusão). Outras células, como células epiteliais, células endoteliais e células musculares, podem também constituir um reservatório para partículas virais no estado latentes uma vez que se tem verificado a presença de DNA viral sem que se verifique a expressão ativa de proteínas virais [45, 47, 48].

#### **1.3.4. Vias de Transmissão**

A transmissão viral, em geral, ocorre, mais frequentemente, por contágio pessoa a pessoa de diferentes formas: transmissão respiratória ou oro-fecal, contacto com fluidos corporais, lesão com objetos contaminados, gravidez, etc. No hospedeiro, os vírus infetam células suscetíveis ligando-se nestas a recetores específicos que lhes permitem entrar nas células e utilizar, como já referido, a sua “maquinaria” celular para biossíntese e replicação, com posterior libertação para a corrente sanguínea – virémia – permitindo a inoculação de tecidos-alvo secundários, distantes do local da infeção primária, e induzindo a libertação de mediadores de inflamação do sistema imunitário Humano. A progressão da doença associada à infeção viral que se desenvolve, depende, não só, da capacidade do sistema imunitário em produzir anticorpos específicos e mediadores de inflamação capazes de parar a contínua replicação viral, mas também da capacidade de recuperação das lesões causadas pela lise das células infetadas e pela ação dos mecanismos imunopatológicos que, atuando sobre o vírus, acabam por destruir também o tecido adjacente [1, 2].

Alguns vírus, especialmente vírus de DNA, como os do grupo Herpes, podem permanecer no tecido hospedeiro de forma latente, sem manifestações clínicas, por longos períodos de tempo, recativando depois sem razão aparente específica e causando manifestações clínicas sintomáticas e recorrentes [1].

No caso de citomegalovírus, e dado o carácter assintomático que muitas vezes a infeção assume, indivíduos infetados são, sem saber, veículos de transmissão do vírus, já que as partículas virais são excretadas, por longos períodos de tempo, nos seus fluidos corporais, como sejam, urina, saliva, lágrimas, sémen, secreções vaginais e leite materno, evidenciando as inúmeras vias de transmissão possíveis e os diferentes tipos de células e tecidos envolvidos. Assim, é razoável afirmar que a infeção primária surge, comumente, por contacto direto com estes fluidos, e a grande variedade de vias de transmissão existentes representa um risco acrescido para os dois grupos mais suscetíveis, como sejam aqueles com um sistema imunitário imaturo (feto e recém-nascido) e os imunocomprometidos (transplantados e HIV positivos, entre outros) [13, 16, 19, 36, 49, 50].

As diferentes vias de transmissão possíveis de CMV permitem concluir, em termos gerais, que ela ocorre pessoa a pessoa por via vertical e horizontal, através de contacto direto ou indireto [17].

A transmissão vertical é a que acontece da mãe para o filho durante a gestação, através da placenta, ou no momento do parto, e é a principal via de infecção congénita. A taxa de transmissão vertical varia com o tipo de infecção materna, sendo a infecção primária durante a gravidez aquela que apresenta um maior risco e uma maior taxa de transmissão para o feto comparativamente à infecção recorrente (reinfeção/reativação) [17, 19].

Na transmissão horizontal incluem-se situações como: contacto sexual (mais significativo no caso de múltiplos parceiros); contacto interpessoal próximo (por exemplo, em ambiente familiar ou escolar, nomeadamente em infantários); exposição a fluidos biológicos de indivíduos infetados (como urina, sangue, secreções respiratórias, etc., em unidades de prestação de cuidados de saúde ou noutras situações); transfusões sanguíneas; transplante de órgãos ou de medula óssea; entre diversas outras possibilidades [29, 51].

### **1.3.5. Epidemiologia**

Citomegalovírus, sendo um parasita humano oportunista e muito bem-adaptado, apresenta uma prevalência na população mundial em geral elevada, podendo ser encontrado tanto em sociedades subdesenvolvidas, com taxas de incidência que podem atingir os 90%, como em países industrializados, onde a taxa de incidência estimada ronda os 60% [13, 19, 24]. A infecção causada por CMV é considerada endémica, não se verificando nenhuma variação relevante em termos sazonais manifestando uma incidência regular ao longo de todo o ano [13, 17, 19].

Estudos mais finos de seroprevalência na população mundial demonstram que a sua ocorrência varia com fatores geográficos, étnicos e condições socioeconómicas. Na realidade, o predomínio de anticorpos anti-CMV específicos parece aumentar com a idade e nos grupos socioeconómicos menos favorecidos [13, 17, 26]. Em regiões com condições socioeconómicas desfavoráveis, a maioria das crianças é infetada antes da puberdade, enquanto que nos países desenvolvidos 40% dos adolescentes são seropositivos, aumentando a prevalência em cerca de 1% por ano de vida [13]. A infecção por CMV é também relativamente comum entre as mulheres em idade reprodutiva, com uma seroprevalência de 45 a 100%. No caso de infecção congénita global por CMV a seroprevalência representa 0,3 a 0,7% de todos os nados vivos [52].

O risco de transmissão congénita de CMV é maior no caso da gestante que desenvolve infecção primária durante a gravidez – aproximadamente 30-39% de infecções primárias maternas resultam na transmissão do vírus ao feto e, destas, cerca de 13% em infecção congénita sintomática do recém-nascido. Infecções recorrentes por CMV na mulher grávida (quer seja por reativação do vírus latente ou por reinfeção com uma nova estirpe) resultam numa taxa de transmissão congénita bastante inferior (a rondar os 1,4%). Estes dados permitem concluir que populações com uma taxa de seroprevalência superior apresentam um menor risco de infecção primária na mulher grávida e, portanto, taxas de infecção congénita sintomática inferiores [52].

Quando o sistema imunitário do hospedeiro não está comprometido, a infecção primária causada por CMV tende a ser assintomática, apresentar sintomas ligeiros ou induzir uma situação clínica conhecida como síndrome de mononucleose [13, 53]. Após a infecção primária o vírus permanece no organismo hospedeiro de forma latente podendo aparecer infecções recorrentes causadas, quer por reinfeção com uma nova estirpe, quer por reativação da forma latente. No entanto, em condições de comprometimento do sistema imunitário a infecção por CMV pode tomar proporções graves, como seja o caso de doentes imunocomprometidos (transplantados e HIV positivos, entre outros) ou com um sistema imunitário imaturo (feto e recém-nascido). Outro dos grupos de risco para esta infecção viral são as mulheres grávidas, em que a possibilidade de transmissão para o feto pode ter graves consequências. A prevalência de infecções primárias e de reinfeções por CMV durante a gravidez varia, igualmente, com fatores socioeconómicos [13, 17].

### **1.3.6. Prevenção**

A ausência de uma vacina aprovada contra CMV faz com que a aposta seja na prevenção da sua transmissão, especialmente nos dois grandes grupos de risco, a mulher grávida e indivíduos imunocomprometidos, que passa pela educação e mudança de hábitos [19].

Tendo isso em mente é essencial sensibilizar estes grupos em particular e a comunidade em geral para medidas simples, mas de importância crucial no controlo da doença, tal como a frequente higienização das mãos e das superfícies de contacto ambientais. É também importante que evitem o contacto com fluidos biológicos de crianças, nomeadamente saliva e urina, por serem um potencial veículo de transmissão, e que lavem bem as mãos sempre que o contacto aconteça. A partilha de objetos pessoais

também é desaconselhada, bem como contactos de proximidade (abraços, beijos, etc). Ao nível dos cuidados em situações de intervenção clínica, como por exemplo transfusões sanguíneas e transplante de órgãos, a prevenção do contágio deve passar pelo recurso a dadores CMV-negativos ou pela eliminação dos leucócitos dos produtos derivados de sangue humano, o que muitas vezes não é viável e pode representar uma sobrecarga para as unidades de saúde [6, 19, 54-57].

CMV continua a ser a maior causa de infeção congénita provocando malformações no feto e recém-nascido e constituindo um problema de saúde pública [14, 58]. Assim, a monitorização da mulher grávida inclui a quantificação de anticorpos do tipo IgG e IgM contra CMV que, embora possa não indicar a presença de uma primoinfeção ou infeção ativa (ausência de IgM), permite ao médico avaliar o estado de imunização da mãe (presença ou ausência de IgG) e sensibilizá-la para as medidas de prevenção e comportamentos adequados. Ainda assim, o ideal seria a existência de um programa de rastreio para a infeção congénita por CMV em grávidas e recém-nascidos. No entanto, os métodos disponíveis atualmente para a deteção de CMV são demorados e dispendiosos, dificultando a sua utilização como métodos de rastreio [13, 59, 60].

### **1.3.7. Diagnóstico**

O diagnóstico da infeção por CMV é feito por técnicas virológicas e moleculares para deteção direta da presença do vírus, ou por metodologias serológicas que revelam uma resposta imune específica do hospedeiro [13, 19].

As técnicas serológicas, que avaliam a resposta imune humoral do hospedeiro, quantificam anticorpos anti-CMV específicos, IgG e IgM, e são úteis, fundamentalmente, para o diagnóstico de infeção primária sintomática e para a avaliação do estado de imunização de dadores e recetores de órgãos e da mulher grávida. Estão disponíveis várias metodologias que permitem a quantificação laboratorial destes anticorpos: imunofluorescência indireta, ELISA, imunocromatografia, quimioluminescência, entre outros. Estas técnicas são, de uma maneira geral, demoradas e dispendiosas, embora a adaptação de algumas delas a sistemas automatizados tenha permitido reduzir bastante o tempo de execução e aumentar muito o volume de amostras processadas por unidade de tempo [13, 26, 36].

A avaliação da imunidade celular dirigida contra CMV, nomeadamente a quantificação de linfócitos T CD8+ e CD4+, tem uma importância significativa em doentes

transplantados nos quais a resposta imunitária está suprimida devido à terapêutica imunossupressora a que estão obrigados. Esta quantificação pode ser realizada por técnicas de citometria de fluxo ou outras [13].

Histologicamente, é possível detetar células infetadas por CMV, em biópsia de tecidos como fígado, pulmão, etc., onde se observam os corpos de inclusão característicos em forma de “olho de coruja” [16, 26]. Para além disso, CMV pode ser isolado a partir diferentes fluidos corporais, como urina, saliva, secreções vaginais, líquido amniótico e sangue, tanto em infeções primárias como em infeções recorrentes, o que torna possível o recurso a diferentes técnicas de deteção direta na sua identificação, de entre as quais se salientam [13, 19, 36]:

- O isolamento viral em cultura, a partir de amostras de produtos biológicos, é o método convencional. O vírus geralmente está presente na urina em grande quantidade, principalmente na infeção congénita, e as culturas são comumente positivas após três a cinco dias de incubação. A viabilidade desta técnica é questionável já que a necessidade de um longo período de incubação dificulta o rápido diagnóstico. Para além disso é dispendiosa e muito trabalhosa o que dificulta a sua aplicação em larga escala [16, 26];

- O diagnóstico molecular, sendo a reação de polimerase em cadeia, “Polymerase Chain Reaction” (PCR), mais concretamente a PCR em tempo real (RT-PCR), a técnica mais amplamente utilizada para a quantificação do DNA de CMV em amostras biológicas. É uma técnica com um elevado grau de sensibilidade e especificidade, mas apresenta um custo elevado e alguma complexidade de execução. Relativamente à cultura viral tem como vantagens a rapidez do resultado e a possibilidade de as amostras serem congeladas e armazenadas [13, 16, 26].

O exposto anteriormente permite afirmar que há uma grande necessidade de desenvolver um método rápido e eficiente, de baixo custo e com a possibilidade de adaptação a sistemas de “point-of-care”, que permita o diagnóstico da infeção por CMV, e uma abordagem efetiva para a prevenção e tratamento das doenças associadas a CMV. Os métodos de diagnóstico disponíveis são, muitas vezes, difíceis de aplicar em larga escala, quer pelo seu tempo de execução alargado, quer pela sua complexidade e custo associado [15, 16].



**Tabela 1.4** Resumo de testes de diagnóstico para identificação de CMV (Adaptado da referência [12])

<b>Teste</b>	<b>Indicador de infecção</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Serológico (IgG/IgM)	IgM IgG	Indicação de infecção primária materna	Possibilidade de falsos positivos
Cultura	Corpos de inclusão “olho de coruja” nas células	O efeito citopático está diretamente relacionado com o título viral	São necessárias 2 a 3 semanas para o diagnóstico
Pesquisa de Antígeno	Antígenos na amostra	Diagnóstico rápido Permite o “screening” de um grande número de amostras	Possibilidade de falsos positivos A leitura de preparações coradas é trabalhosa e demorada
Ensaio imunológico	Antígenos na amostra	Diagnóstico rápido Permite a utilização de amostras de tecido frescas ou congeladas	Possibilidade de falsos negativos A leitura de preparações coradas é trabalhosa e demorada
Molecular (Pesquisa de DNA por PCR)	DNA	Elevada sensibilidade e especificidade	Necessária perícia técnica Instrumentação e método dispendiosos
Pesquisa in-situ (sondas diretamente nos tecidos - Pesquisa direta da DNA)	DNA	Diagnóstico rápido	Necessária perícia técnica Instrumentação e método dispendiosos
Ensaio antígeno	Antígeno pp65 (diretamente nas células)	Linfócitos e outras células	A leitura de preparações coradas é trabalhosa e demorada Número limitado de amostras processadas por teste
Ultra-sons (Mulher grávida)	Identificação de malformações fetais (se confirmada infecção por CMV)	Não invasivo Permite identificar infecção fetal sintomática	Não específico para CMV



## **1.4. Imunoensaios**

Imunoensaio é o termo utilizado para designar um método analítico que tem por base uma ligação de afinidade específica, e altamente seletiva, que ocorre entre um antígeno e o respectivo anticorpo. Assim, os imunoensaios estão entre os testes analíticos mais sensíveis e específicos tendo possibilitado o desenvolvimento de diversas técnicas analíticas utilizadas tanto na rotina clínica laboratorial como na investigação. No laboratório clínico os imunoensaios são amplamente utilizados na determinação de uma grande variedade de analitos, como sejam anticorpos, hormonas, marcadores tumorais e cardíacos, fármacos, etc, e no diagnóstico e monitorização de doenças infecciosas [61-63].

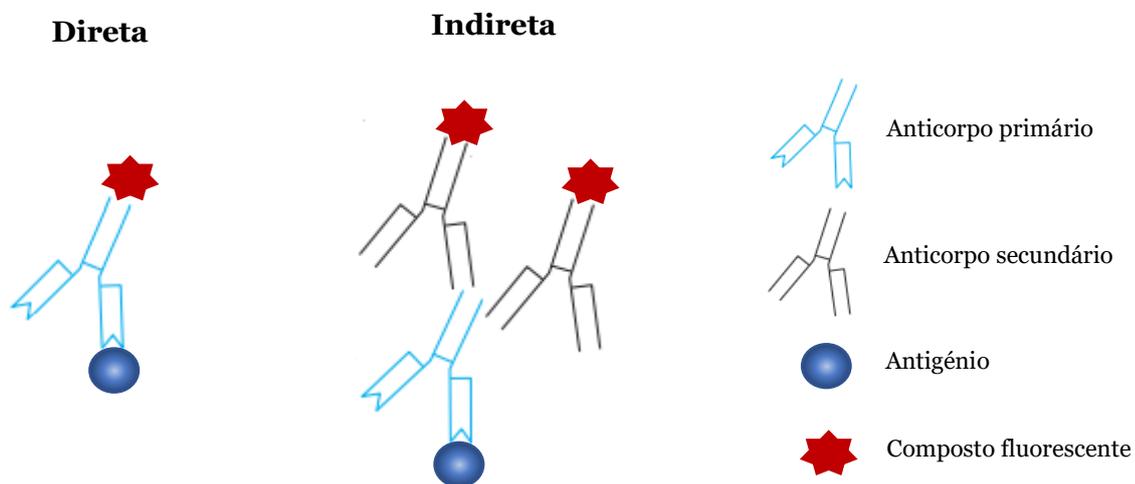
Nestas técnicas, um dos agentes imunológicos, antígeno ou anticorpo, é geralmente imobilizado num suporte sólido e a reação caracteriza-se pela formação de complexos antígeno-anticorpo, que são marcados com compostos que se ligam covalentemente aos antígenos ou anticorpos e que, por apresentarem propriedades apropriadas para a deteção, permitem a sua quantificação [61, 64, 65].

Atualmente existem três classes principais de testes que utilizam esta metodologia: imunoensaios de fluorescência (imunofluorescência) (IF), em que um composto fluorescente é conjugado com o anticorpo; radio-imunoensaio (RIA), onde se estabelece a ligação de isótopos radioativos aos antígenos ou anticorpos; e imunoensaios enzimáticos, que utilizam anticorpos ou antígenos conjugados com enzimas [65].

### **1.4.1. Imunofluorescência**

A imunofluorescência é uma técnica laboratorial comum na qual se promove a ligação covalente entre um anticorpo e um corante fluorescente, para marcar um antígeno alvo específico, permitindo identificar a presença e a distribuição das moléculas alvo na amostra com recurso a técnicas de microscopia de fluorescência ou de leituras de intensidade da luz fluorescente emitida pela amostra. Esta combinação de um anticorpo específico com um composto fluorescente permite a aplicabilidade desta técnica na localização e deteção de uma grande variedade de compostos e antígenos em diferentes tipos de tecidos, preparações celulares e amostras biológicas, denotando a sua importância tanto no laboratório clínico e no acompanhamento e monitorização de doentes como em projetos de investigação científica [66-69].

Distinguem-se dois tipos de técnicas de IF, direta e indireta. Na IF direta é utilizado apenas um anticorpo (anticorpo primário) acoplado covalentemente a um agente fluorescente. O anticorpo reconhece e liga-se à molécula alvo (antigénio) e o agente fluorescente possibilita a deteção. Na IF indireta são utilizados dois anticorpos, um anticorpo primário, que se liga ao agente antigénico, e um anticorpo secundário, marcado com o composto fluorescente, que reconhece e se conjuga com o anticorpo primário. Esta técnica é mais complexa e demorada do que a direta uma vez que envolve mais um período de incubação sendo, no entanto, mais sensível já que mais do que um anticorpo secundário (marcado fluorescentemente) se pode ligar a cada anticorpo primário aumentando o número de moléculas do composto fluorescente por antigénio e, desta forma, amplificando o sinal de fluorescência emitido [66, 68].



**Figura 1.6** Esquema da técnica de imunofluorescência direta e indireta

#### 1.4.2. Radio-Imunoensaios (RIA)

Radio-imunoensaio é uma técnica muito sensível e específica, e facilmente adaptável a sistemas automatizados, na qual um antigénio alvo específico é marcado com um isótopo radioativo (a marcação de um anticorpo ao invés de um antigénio também é utilizada, mas menos frequente) [66, 70, 71].

A quantificação do antigénio na amostra baseia-se na reação de competição por um recetor comum (anticorpo), cuja quantidade se conhece, entre uma substância a ser determinada (antigénio da amostra) e a mesma substância marcada

radioisotopicamente (antígeno + isótopo radioativo). A concentração do antígeno alvo é então calculada por medidas de radioatividade, sendo inversamente proporcional à radioatividade da amostra [66, 72].

A grande desvantagem desta técnica é a perigosidade de se trabalhar com substâncias radioativas, a necessidade de equipamentos específicos que cumpram determinados requisitos legais e as medidas de segurança legalmente exigidas, o que implica o recurso a pessoal altamente qualificado e encarece o processo laboratorial [71, 73, 74].

### **1.4.3. Imunoensaios Enzimáticos**

Imunoensaios enzimáticos (EIA, do inglês “Enzymatic Imuno-Assay”) são todas as técnicas que utilizam enzimas para marcar a reação específica antígeno-anticorpo, característica de qualquer imunoensaio. Nestes, têm particular relevância os ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA, do inglês “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”) que estão na base dos mais amplamente utilizados métodos serológicos para a quantificação de substâncias como proteínas, anticorpos, hormonas, etc, na rotina laboratorial, desempenhando um importante papel no diagnóstico e monitorização de diversas patologias [63, 75, 76].

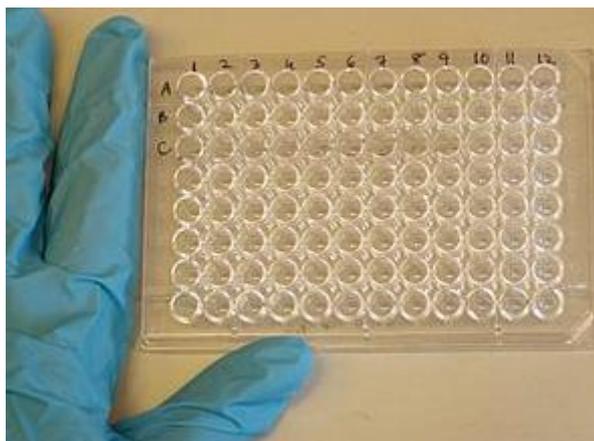
Na metodologia ELISA utilizam-se anticorpos ou antígenos conjugados com enzimas e a posterior incubação com um substrato específico que gera um produto de reação de cor visível e mensurável por espectrofotometria. O fundamento do teste baseia-se, então, na interação antígeno-anticorpo específica e a conjugação com enzimas (tendo em conta as suas propriedades) permite alcançar níveis de sensibilidade e especificidade elevados (comparáveis aos métodos de raio-imunoensaio) e facilmente adaptar o método a sistemas automatizados [66, 75-77].

A sua simplicidade, facilidade de execução, versatilidade e baixo custo (quando comparados com outros imunoensaios), associados à elevada sensibilidade e especificidade e ao facto de utilizar reagentes seguros e estáveis (contrastando com os compostos radioativos dos ensaios RIA), possibilitar a utilização de equipamentos simples (como um espectrofotómetro) e até mesmo a facilidade de automatização, permitiu alargar muito o campo de aplicação dos testes ELISA, que se foram tornando cada vez mais importantes, não só na rotina laboratorial e monitorização de doentes (onde diferentes análises podem ser realizadas simultaneamente na mesma amostra devido à sua elevada eficiência), mas também nos laboratórios de investigação. No

entanto, apresentam também algumas dificuldades de execução, como sejam o trabalho extensivo necessário à preparação dos anticorpos, a possibilidade de falsos positivos ou falsos negativos, que podem ser causados por um bloqueio insuficiente da fase sólida, e a instabilidade dos anticorpos, que necessitam de refrigeração permanente quer no transporte quer no armazenamento. Para além disso, é uma técnica trabalhosa e demorada uma vez que envolve vários passos e períodos de incubação (para estabelecimento das ligações antigénio-anticorpo específicas) e lavagem (para remoção dos excedentes não ligados), antes da leitura espectrofotométrica final para obtenção do resultado [77-80].

Tradicionalmente os testes ELISA são realizados em placas de poliestireno de 96 poços, como a que se pode observar na figura 1.7, e, em termos gerais, incluem a imobilização de um antigénio (ou anticorpo) numa fase sólida, a incubação com um anticorpo específico marcado enzimaticamente e a adição do substrato enzimático específico que vai permitir a mudança de cor e a respetiva deteção por espectrofotometria. A imobilização num suporte sólido facilita a separação dos constituintes ligados e não ligados durante a realização do ensaio [75, 81, 82].

De entre as enzimas utilizadas como geradoras de sinal nos teste ELISA, destacam-se a fosfatase alcalina, a peroxidase de rábano (HRP, do inglês “horseradish peroxidase”) e a  $\beta$ -galactosidade por apresentarem características essenciais, como a catálise de reações altamente sensíveis, a disponibilidade de substratos específicos, a estabilidade e a facilidade de conjugação com anticorpos e outras proteínas. Por exemplo, a HRP catalisa a conversão do substrato cromogénico 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) num produto de cor visível. Estas reações enzima-substrato estão, normalmente, completas ao fim de 30-60 minutos e a sua paragem é induzida pela adição de uma solução apropriada ao meio reacional em questão (por exemplo, ácido sulfúrico). Finalmente, a cor desenvolvida é avaliada visualmente ou medida num espectrofotómetro na gama dos 400-600 nm [66, 75-77, 81].



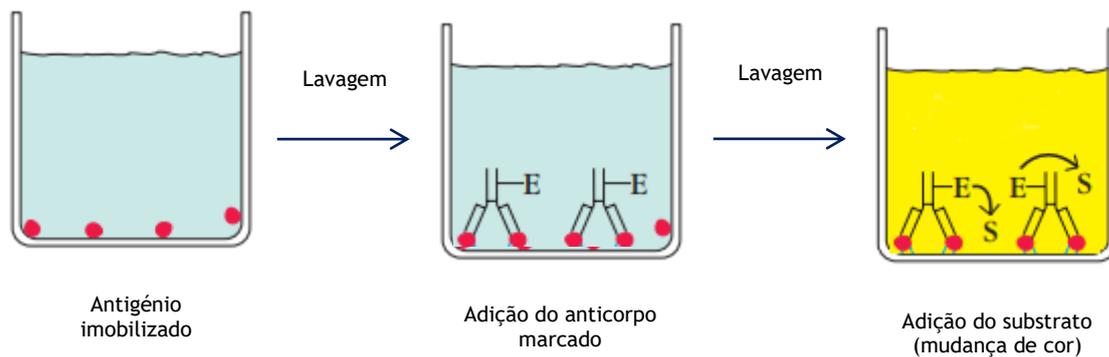
**Figura 1.7** Placa de poliestireno de 96 poços utilizada na realização de testes ELISA

Ao longo dos tempos, e uma vez que a estrutura e as características das substâncias a serem analisadas por este tipo de metodologia, quer ao nível da investigação quer ao nível da prática clínica, diferem muito entre si, foram desenvolvidas diferentes configurações para as técnicas ELISA e designadas por ELISA direto, ELISA indireto, ELISA “sandwich” e ELISA competitivo. Apesar das suas diferentes configurações, todas elas são constituídas por três elementos essenciais: o sistema de captura (fase sólida para a imobilização do antígeno ou anticorpo), o analito (a substância a analisar, que pode ser um antígeno ou um anticorpo) e o sistema de deteção [75, 81].

#### **1.4.3.1. ELISA Direto**

O teste ELISA direto representa a configuração mais simples dos testes ELISA e serviu de base ao desenvolvimento de todas as outras configurações [75, 77].

O primeiro passo desta técnica consiste na imobilização de um antígeno ou anticorpo alvo na superfície de uma placa de microtitulação. De seguida, é adicionada uma proteína (por exemplo, albumina) para bloquear os locais de ligação ainda disponíveis e evitar adsorções não específicas. O complexo enzima-anticorpo ou enzima-antígeno é, então, colocado no meio e favorecida a sua reação com o alvo imobilizado - incubação. Após a incubação, o excedente de antígenos ou anticorpos não ligados, é retirado do meio reacional por lavagem. A deteção do alvo é possível pela adição de um substrato específico para a enzima e a reação enzimática que ocorre é acompanhada pelo desenvolvimento de cor. A intensidade da cor desenvolvida é tanto maior quanto maior for a quantidade de antígeno ou anticorpo alvo presente no meio [75, 77].

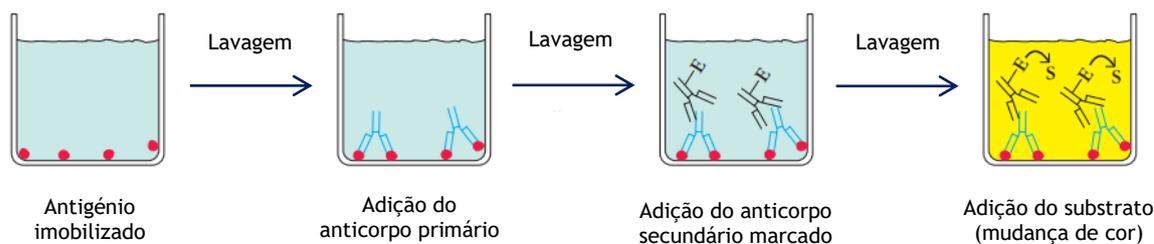


**Figura 1.8** Representação esquemática da técnica ELISA direta (Adaptado de referência [66])

### 1.4.3.2. ELISA Indireto

Tendo por base a metodologia do teste de ELISA direto surgiu o ELISA indireto, no qual está envolvido um segundo anticorpo (anticorpo secundário) sendo este o que determina a detecção do antigênio alvo, e não o anticorpo primário. Nesta técnica, a amostra em estudo, que contém o anticorpo primário, é adicionada aos poços da placa de ELISA onde está imobilizado o antigênio. Durante a incubação o anticorpo primário presente na amostra liga-se ao antigênio, formado complexos antigênio-anticorpo específicos que são identificados pela adição ao meio reacional de um anticorpo secundário marcado enzimaticamente. Um passo de lavagem antecede a adição do anticorpo secundário e permite a remoção de excedentes do meio reacional. A adição do substrato específico para a enzima, após incubação com o anticorpo secundário e lavagem, induz o desenvolvimento de cor e possibilita a determinação da concentração da substância alvo. A concentração será tanto maior quanto maior a intensidade da cor desenvolvida [66, 75, 77].

Assim, nesta técnica existem dois momentos de incubação que correspondem aos passos de ligação do anticorpo primário e do anticorpo secundário marcado com a enzima, e o antigênio alvo é detectado indiretamente pelo anticorpo secundário [77].

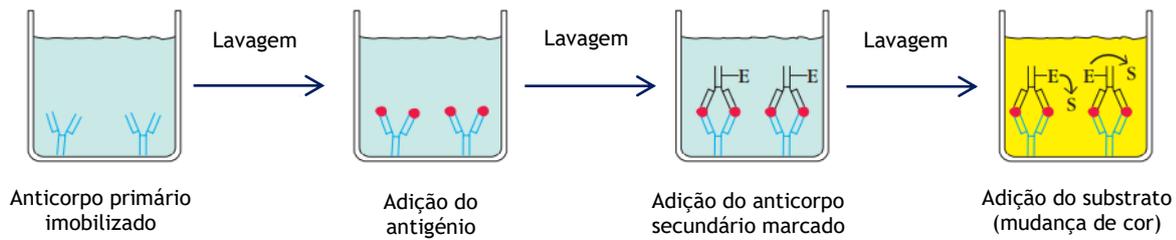


**Figura 1.9** Representação esquemática da técnica ELISA indireta (Adaptado de referência [66])

### 1.4.3.3. ELISA “Sandwich”

No teste ELISA sandwich a amostra em estudo (que contém o antígeno alvo) é adicionada aos poços da placa de poliestireno, que foram revestidos com o anticorpo de captura (anticorpo primário) e bloqueados para evitar adsorção não específica de outras proteínas. Após incubação, que favorece a captura do antígeno alvo pelos anticorpos imobilizados nos poços da placa, e lavagem, para remoção de excedentes não ligados, é adicionado um segundo anticorpo (anticorpo secundário), específico para o antígeno capturado e marcado com uma enzima. Uma segunda incubação vai permitir a ligação do anticorpo secundário ao antígeno que já se encontra ligado ao anticorpo primário. Nova lavagem antecede a adição do substrato específico da enzima, que permite avaliar a atividade enzimática pela mudança de cor meio reacional. A intensidade da cor será tanto maior quanto maior for a concentração do antígeno alvo na amostra em estudo e é determinada por espectrofotometria do visível [66, 75, 77].

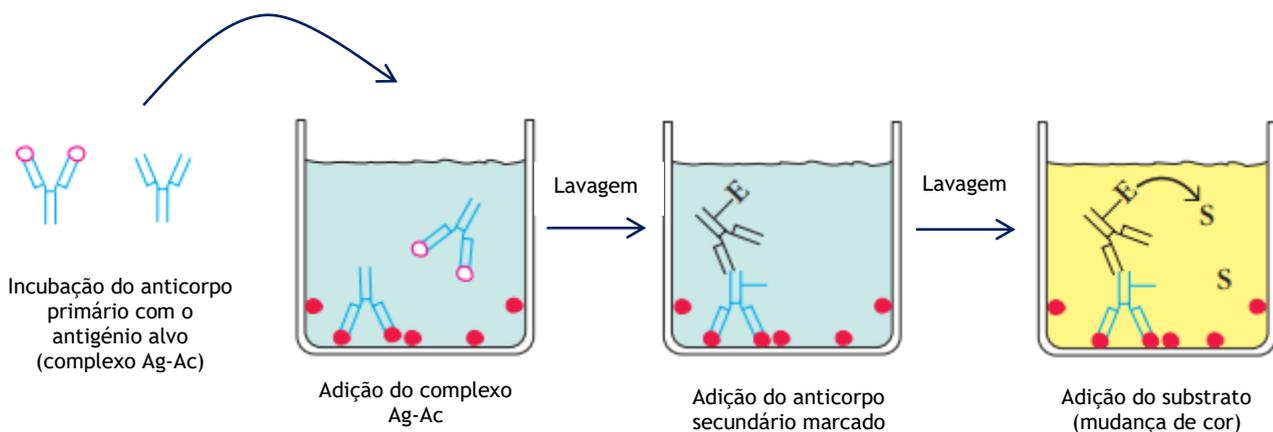
O nome sandwich atribuído a esta técnica resulta do facto do antígeno alvo ficar “aprisionado” entre dois anticorpos específicos e esse facto contribui para a maior sensibilidade desta técnica em relação ao método direto e indireto. Muito embora a grande vantagem desta técnica ao nível da sensibilidade, ela apresenta como desvantagens o facto de ser muito trabalhosa e dispendiosa, uma vez que envolve a preparação de dois anticorpos, e mais demorada do que as anteriores [75, 77].



**Figura 1.10** Representação esquemática da técnica ELISA “sandwich” (Adaptado de referência [66])

#### 1.4.3.4. ELISA Competitivo

Na configuração competitiva o anticorpo primário é inicialmente incubado com a amostra que contém o antígeno alvo e a mistura é posteriormente adicionada aos poços da placa de microtitulação. O antígeno alvo é também imobilizado na superfície dos poços da placa. Quanto maior for a quantidade de antígeno presente na amostra, menor será a quantidade de anticorpo livre para se ligar ao antígeno imobilizado nos poços. O anticorpo secundário marcado enzimaticamente é então adicionado permitindo avaliar a quantidade de anticorpo primário ligado ao antígeno imobilizado na placa. Após a lavagem dos poços e a adição do substrato enzimático, a cor desenvolvida permite calcular a concentração da amostra. Neste caso há uma relação inversa entre a intensidade da cor desenvolvida e a concentração do antígeno alvo na amostra, uma vez que, quanto maior for a quantidade de antígeno alvo na amostra, menor será a quantidade de anticorpo marcado que se liga ao anticorpo imobilizado [66, 75, 77].



**Figura 1.11** Representação esquemática da técnica ELISA competitiva (Adaptado de referência [66])

#### **1.4.3.5. Imunoensaios Enzimáticos Baseados em Partículas Magnéticas**

Sendo indiscutíveis as vantagens dos métodos espectrofotométricos ELISA convencionais, como a sua elevada sensibilidade, relativa facilidade de execução, boa adaptação a sistemas automatizados e diversas aplicações na análise de amostras biológicas na prática clínica, entre outras, não se podem também esquecer as suas limitações, como sejam, o custo elevado (muito associado à grande quantidade de anticorpo imobilizado nos poços da microplaca), a cinética lenta do ensaio e a possibilidade de adsorções não específicas de conjugados e/ou de interferentes da matriz da amostra nos poços da microplaca [83]. No sentido de tentar ultrapassar algumas destas limitações, surgiram recentemente os ensaios imunomagnéticos, cuja metodologia e baseia nos princípios ELISA, mas que utiliza partículas magnéticas (MBs, do inglês “Magnetic Beads”) funcionalizadas como suporte sólido para a imobilização de anticorpos específicos. São os chamados imunoensaios enzimáticos baseados em partículas magnéticas (mpEIA, do inglês “magnetic particle-based Enzyme Immunoassays”) [83, 84].

Os imunoensaios mpEIA apresentam-se como um novo formato de imunoensaios simples e não invasivos, possibilitando uma vasta gama de aplicações, essencialmente, devido às vantagens associadas à utilização de partículas magnéticas, de entre as quais se destacam, a facilidade de manipulação sob a ação de um simples separador magnético, que melhora a eficiência dos processos de lavagem e separação, minimizando o efeito da matriz de amostras complexas; o aumento da área de superfície da fase sólida, em comparação com a superfície plana dos poços de uma microplaca clássica, e, conseqüentemente, da maior probabilidade de interação com o alvo, potencia o aumento da eficiência do processo; o aumento da cinética do ensaio devido à dispersão das partículas, privilegia as interações de afinidade; as partículas magnéticas encontram-se, frequentemente, funcionalizadas com outros materiais melhorando a sua capacidade de captura [83, 84].

De uma forma simplista, podemos dizer que os imunoensaios mpEIA não são mais do que um ensaio espectrofotométrico ELISA com utilização de partículas magnéticas. De facto, é prática comum o recurso a microplacas de 96 poços para a realização do ensaio, tal como acontece no ELISA convencional.

## 1.4.4. Outros Imunoensaios

### 1.4.4.1. Imunossensores

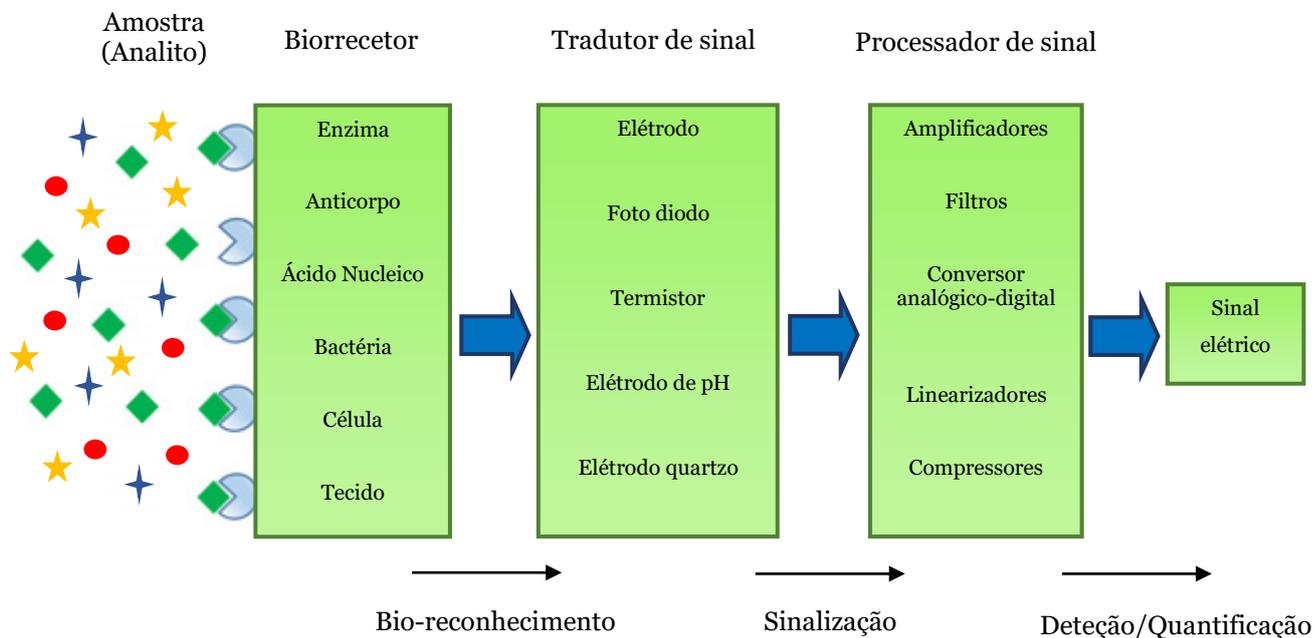
Como alternativa aos imunoensaios convencionais, apresentados anteriormente, e numa perspectiva de encontrar opções mais vantajosas em termos de custos e/ou de tempo e simplicidade de execução, mas mantendo elevada sensibilidade e especificidade, e que possibilitassem a detecção de agentes patogênicos e moléculas com interesse fisiológico, facilitando o diagnóstico precoce e a atuação num estágio inicial da doença, começaram a surgir sistemas que utilizam os mesmos princípios das reações de afinidade antígeno-anticorpo como a base dos seus fundamentos. Esses sistemas são os chamados imunossensores [85, 86].

Os imunossensores, uma categoria específica de biossensores, são definidos como dispositivos bioanalíticos que se apresentam como uma alternativa aos imunoensaios convencionais, utilizados para detetar analitos que interagem seletivamente com biomoléculas específicas (“sonda” ou “molécula de captura”) imobilizadas no sensor (biorreceptor), podendo ter aplicação, entre outras, também na detecção de vírus em fluidos corporais (sangue, urina, saliva, etc.). Estes dispositivos utilizam reagentes e anticorpos específicos como elemento de ligação para detetar e/ou quantificar antígenos que, no caso dos vírus, são estruturas moleculares presentes na sua superfície. A interação do analito com o biorreceptor gera um sinal mensurável que é proporcional à sua concentração na amostra [87-89].

Um biossensor típico é constituído por três elementos principais (figura 1.12) [86, 88, 90, 91]:

- 1) **Sistema de reconhecimento biológico** (biorreceptor): biocomponente imobilizado (enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, células, etc.) capaz de detetar um analito alvo específico. É essencial para garantir especificidade e seletividade em relação ao alvo analítico e evitar a interferência de outra(s) substância(s) presente(s) na amostra;
- 2) **Transdutor ou conversor**: mede as alterações que ocorrem nas propriedades físico-químicas do sistema de reconhecimento biológico (produção de uma nova substância, libertação de calor, transferência de eletrões, alteração de pH, etc.), durante a interação com a substância alvo, e converte esse sinal biológico num sinal elétrico mensurável;

- 3) **Unidade de processamento de sinal:** responsável pela amplificação e apresentação num formato apropriado (visor digital, impressão, sistema de mudança de cor, etc.) do sinal mensurável que recebe do transdutor.



**Figura 1.12** Representação esquemática de um biossensor (Adaptado de referências [88 e 90])

Os biossensores podem ser classificados de duas formas: de acordo com o método de conversão de sinal (tipo de transdutor), que pode ser óptico, eletroquímico ou mecânico, ou de acordo com o tipo de sensor do sistema de biorreconhecimento. Neste caso, surgem duas categorias principais: os sensores biocatalíticos, que utilizam enzimas, e os sensores de bioafinidade, que utilizam proteínas de ligação ou nucleótidos e nos quais se incluem os imunossensores [89-92]. A escolha do suporte biológico a utilizar e do transdutor adequado depende das propriedades da amostra que se pretende analisar (e da substância alvo de interesse) e do tipo de grandeza física a ser medida [91].

Os imunossensores são, então, biossensores de afinidade que utilizam a ligação anticorpo-antígeno para detetar um antígeno alvo, como resultado da ligação específica que se estabelece entre o antígeno e a região específica de um anticorpo, imobilizado na superfície de um eletrodo. Neste caso, o anticorpo funciona como biorreceptor o antígeno representa o analito alvo e o transdutor possibilita a determinação da concentração do antígeno (93, 94).

Os imunossensores têm sido concebidos com a premissa de virem a desempenhar um importante papel na saúde pública, oferecendo aplicações de deteção rápida, elevada

sensibilidade e especificidade, baixo custo e que possam ser miniaturizados, em áreas como a química clínica, a segurança alimentar, a monitorização ambiental, a detecção de doenças, e muitas outras. Em termos de diagnóstico e monitorização de doenças, como cancro, ou na detecção e quantificação de agentes patogénicos, as vantagens da sua utilização passam também pela possibilidade de aplicação a sistemas de “point-of-care”, pelo que o desenvolvimento deste tipo de dispositivos tem sofrido avanços significativos [85, 88, 90].

#### **1.4.4.2. Imunossensores para a Detecção de CMV**

Na literatura são encontradas poucas referências relativas a novos métodos de detecção de CMV. Duas dessas referências dizem respeito a técnicas de reconhecimento eletroquímico de sequências amplificadas de DNA, utilizando sistemas de biossensores miniaturizados [95, 96]. Um dos grupos de investigação apresentou a proposta de um biossensor baseado em elétrodos de carbono serigrafados (“screen-printed”) descartáveis para a detecção de DNA de CMV amplificado [95], enquanto que o outro explorou uma estratégia baseada na utilização de nanopartículas de ouro coloidais como marcadores, para a quantificação sensível de uma sequência amplificada de DNA de CMV de 406 pares de bases [96]. No entanto, ambos os métodos descritos são usados em conjunto com uma técnica de PCR, tornando-os dispendiosos e sem possibilidade de utilização como sistemas de “point-of-care” [95, 96].

Outros autores descreveram um sensor piezoelétrico para detetar a glicoproteína B de CMV, no qual os anticorpos (biorreceptor) foram imobilizados num elétrodo de ouro. Muito embora esta técnica não necessite da amplificação de DNA, ela apresenta um custo elevado devido à utilização de instrumentação cara [97].

Adicionalmente, foi também desenvolvido um dispositivo de detecção baseado em imunofluorescência, no qual uma amostra biológica é aplicada numa superfície de ouro revestida com anticorpos anti-CMV específicos. CMV presente na amostra fica retido na superfície, por ligação aos anticorpos, e a intensidade da fluorescência permite distinguir ensaios positivos e negativos. A principal desvantagem deste dispositivo é a baixa sensibilidade, o que compromete sua aplicabilidade em amostras com baixa carga viral [98].

Recentemente, foi descrito um imunossensor eletroquímico, sensível e altamente específico, para a detecção do antígeno pp65 de CMV, que utiliza HRP e nanopartículas

de paládio e platina, numa base de carbono do tipo “single-walled carbon nanohorns”, para imobilizar os anticorpos. Esta abordagem permitiu a deteção rápida de CMV, no entanto, o uso de elétrodos de carbono vítreo não é uma alternativa prática para um sistema de “point-of-care” [99].

Pires *et al* em 2015, recorrendo a tecnologia do tipo “screen-printed”, propuseram um modelo de imunossensor eletroquímico, baseado num imunoensaio em “sandwich”, para a deteção da glicoproteína B de CMV em amostras de urina. Neste modelo, a glicoproteína B é capturada por um anticorpo anti-CMV específico, imobilizado no elétrodo de trabalho, e um segundo anticorpo marcado com nanopartículas de ouro, adicionado posteriormente, liga-se aos locais disponíveis da glicoproteína permitindo a sua deteção. A deteção da glicoproteína B foi realizada por análise eletroquímica quantitativa de nanopartículas de prata depositadas no imunossensor, numa reação redox catalisada pelas nanopartículas de ouro utilizadas para marcar o segundo anticorpo. Este dispositivo mostrou uma resposta idêntica quer em amostras de glicoproteína B preparadas com tampão, quer quando foram utilizadas amostras de urina, sugerindo que a matriz biológica da amostra não interfere com a capacidade de deteção do imunossensor [15].

O mesmo grupo de investigação propôs ainda um outro modelo de imunossensor, baseado também num imunoensaio do tipo “sandwich”, para a deteção espectrofotométrica da glicoproteína B de CMV em amostras de urina, de forma rápida e simples. Neste modelo, o anticorpo anti-CMV específico foi imobilizado em partículas magnéticas funcionalizadas com proteína G, permitindo uma imobilização orientada do anticorpo e, conseqüentemente, um reconhecimento mais efetivo da glicoproteína B. O anticorpo secundário adicionado foi marcado com HRP para permitir a deteção espectrofotométrica [36]. O trabalho desenvolvido na presente dissertação tem por base este estudo previamente realizado.



## 2. Objetivos

Citomegalovírus é um importante agente patogénico humano, que pode causar doença severa em indivíduos imunocomprometidos ou com um sistema imunitário imaturo. É também responsável por uma grande parte das infeções congénitas estando referenciado como constituindo um problema de saúde pública.

A possibilidade de permanência no organismo do hospedeiro em estado de latência e o facto de provocar doença assintomática em indivíduos imunocompetentes, dificulta o controlo da transmissão e representa um problema acrescido, especialmente para os principais grupos de risco, como sejam os indivíduos imunocomprometidos, a mulher grávida, pela possibilidade de transmissão ao feto, e o recém-nascido.

Desta forma, a existência de programas de rastreio em larga escala que permitissem a identificação de possíveis fontes de contágio, seria uma mais-valia. No entanto, os métodos de diagnóstico disponíveis tendem a ser morosos, dispendiosos e com uma complexidade de execução que dificulta a sua aplicação em larga escala representando uma sobrecarga para o sistema de saúde.

Do apresentado anteriormente é fácil perceber que seria de grande utilidade o desenvolvimento de um sistema simples, seguro, barato e fiável, com um elevado grau de sensibilidade e especificidade, que permitisse a deteção e quantificação de CMV e que pudesse ser integrado em programas de rastreio e monitorização em larga escala.

Neste sentido, e para tentar contornar as dificuldades em termos de custos e tempo de execução inerentes às técnicas de diagnóstico disponíveis, foi desenvolvido por uma equipa de investigação da UBI um imunossensor eletroquímico descartável, que se pretende validar como um teste de rastreio simples, rápido, económico, de fácil manuseamento e que possa ser utilizado “à cabeceira do doente” como dispositivo “point of care”. A base de funcionamento do imunossensor para a deteção de CMV é um imunoensaio do tipo mpEIA, com uma configuração em “sandwich”, utilizando anticorpos específicos contra a glicoproteína B de CMV (interação antigénio-anticorpo).

O presente trabalho tem como objetivo completar o trabalho precedente e avançar para a segunda fase de validação do imunossensor, que consiste na avaliação da sua aplicação a amostras biológicas, que foram previamente analisadas laboratorialmente para pesquisa de DNA de CMV por técnica molecular (PCR em tempo real), e para as

quais se tem conhecimento da presença ou ausência de CMV. Assim, numa primeira fase, as amostras biológicas serão analisadas por um imunensaio enzimático baseado em partículas magnéticas, o qual constitui o sustentáculo de funcionamento do imunossensor eletroquímico anteriormente desenvolvido pelo grupo, pretendendo-se determinar os valores de sensibilidade, especificidade e o “cut-off” da técnica.

## **3. Materiais e Métodos**

### **3.1. Estudo**

Validação de um imunossensor, previamente construído com base num imunoensaio enzimático baseado em partículas magnéticas e de configuração em “sandwich”, pelo estudo da sua aplicabilidade em amostras biológicas, usando como método de referência a pesquisa de ADN de CMV por PCR em Tempo Real.

Nesta fase foi feita a aplicação do ensaio mpEIA, a diferentes amostras biológicas, para deteção de CMV.

### **3.2. Amostra**

A amostra foi constituída por alíquotas de amostras biológicas humanas, cedidas pelo Laboratório Central SYNLAB Health II (Lisboa, Portugal), laboratório que opera na área das análises clínicas. As amostras tinham pedido médico para “Pesquisa de DNA/carga viral de CMV” e foram analisadas por técnica molecular de referência (RT-PCR), sendo conhecido o respetivo resultados analítico (“Detetável”/“Não detetável”). Apresentavam uma distribuição aleatória em termos de género e faixa etária, tinham origem em diferentes produtos biológicos (urina, plasma de EDTA, líquido amniótico, leite materno, etc.) e diferentes proveniências (hospitalar e ambulatório).

As amostras foram armazenadas a -80 °C até à sua utilização. Os ensaios experimentais foram realizados no período entre junho e setembro de 2020, utilizando um imunoensaio mpEIA “sandwich” com leitura de absorvâncias a 450 nm.

#### **3.2.1. Ética e Confidencialidade**

O protocolo de investigação do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior (Anexo 1).

Nesse protocolo foram definidos alguns critérios de caracterização e utilização das amostras biológicas cedidas pelo laboratório de origem, nomeadamente:

- As amostras procedem da atividade de prestação de serviços do laboratório SYNLAB Health II na área do diagnóstico laboratorial, sendo respeitados integralmente todos os procedimentos éticos inerentes à sua obtenção;
- São excedentes de amostras encaminhadas ao laboratório SYNLAB Health II com pedido médico para pesquisa de ADN de CMV. Em nenhuma circunstância a utilização de amostras para o presente estudo pôs em risco o diagnóstico, pelo que as amostras selecionadas pelo laboratório de origem foram, exclusivamente, as consideradas excedentárias para o diagnóstico;
- Para o doente/utente não houve nenhuma alteração ao procedimento normal de colheita e obtenção da amostra biológica, uma vez que as amostras excedentárias utilizadas neste trabalho tinham origem em amostras que foram previamente enviadas ao laboratório SYNLAB Health II para diagnóstico de CMV;
- De forma a garantir o anonimato e confidencialidade do processo, as amostras foram codificadas numericamente no laboratório de origem. Essa codificação apenas definiu o tipo de amostra e o resultado da pesquisa de CMV;
- Qualquer informação pessoal, ou de outro tipo, relativa à origem da amostra foi ocultada pelo que a equipa de investigação não teve conhecimento dela.

### **3.3. Reagentes**

#### **3.3.1. Anticorpos**

Para a realização do imunoensaio experimental foram utilizados dois anticorpos anti-glicoproteína B de citomegalovírus. Um anticorpo primário e um anticorpo secundário marcado com enzima HRP (Abcam ab6499 e ab69245, respetivamente) (Cambridge, Reino Unido).

##### **3.3.1.1. Anticorpo Primário**

Como anticorpo primário foi utilizado um anticorpo monoclonal (mAb1) dirigido contra a glicoproteína B do envelope de citomegalovírus, comercializado numa concentração de 1 mg/mL.

Após a receção o anticorpo foi alíquotado e conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para evitar ciclos de congelação-descongelação durante a sua utilização, respeitando as indicações do fabricante.

### **3.3.1.2. Anticorpo Secundário**

Como anticorpo secundário foi utilizado um anticorpo policlonal, dirigido contra a glicoproteína B de CMV e que se encontrava conjugado com enzima HRP (Ab2-HRP), comercializado numa concentração de 1,5 mg/mL.

À semelhança do anticorpo primário, também o anticorpo secundário foi alíquotado, após a sua receção, e conservado a  $+4^{\circ}\text{C}$ , de acordo com as indicações do fabricante.

### **3.3.2. Partículas Magnéticas**

As partículas magnéticas utilizadas encontram-se funcionalizadas com proteína G (MBs-PrG) (“Dynabeads® Protein G”, Novex® Life Technologies™ da ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). A sua concentração é de 30 mg de MBs/mL, em tampão fosfato pH 7,4, e têm uma capacidade de ligação de, aproximadamente, 8  $\mu\text{g}$  de anticorpo/mg de MBs-PrG.

### **3.3.3. Tampão Fosfato**

O tampão fosfato (PBS) 0,1 M pH 7.4 foi preparado a partir de:

- Fosfato monossódico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha)
- Fosfato dissódico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) (Fisher Scientific, Bishop's Stortford, Reino Unido)

### **3.3.4. Outros Reagentes**

Para a realização dos ensaios experimentais foram ainda utilizados os seguintes reagentes:

- Substrato líquido para o sistema mpEIA: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha) (solução comercializada na diluição pronta a usar)

- Solução de albumina de soro bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, Madrid, Espanha), preparada a 4% (m/v) em PBS 0,1 M pH 7,4
- Solução 0,5 M de ácido Sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) (Panreac, Barcelona, Espanha)
- Tampão não-proteico de bloqueio “Pierce® Protein-Free” (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Todas as soluções de trabalho necessárias foram preparadas utilizando reagentes de qualidade analítica (listados acima) e água ultrapura tipo I Milli-Q (Millipore, Burlington, MA, USA).

### 3.4. Equipamentos

A técnica mpEIA foi realizada por metodologia manual utilizando microplacas padrão de poliestireno com 96 poços (Figura 1.7) (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha).

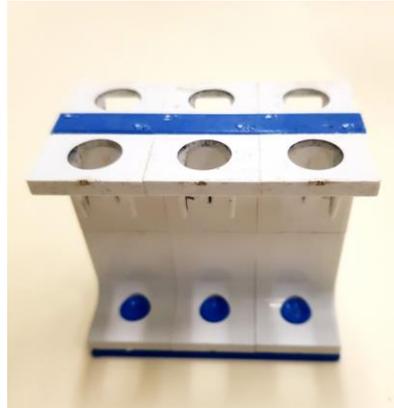
A leitura das absorvâncias da microplaca foi realizada num espectrofotômetro de microplacas xMark da Bio-Rad, modelo 680 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Espectrofotômetro de microplacas xMark, Bio-Rad

Para a preparação das partículas magnéticas foi utilizado um separador magnético com 6 posições, adaptáveis a tubos do tipo eppendorf de 1,5 mL de capacidade (figura 3.2).

Para separar as partículas magnéticas do sobrenadante nos poços da microplaca, foi utilizado um separador magnético para placas de 96 poços, Novex® Life Technologies™ da ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, USA) (figura 3.3).



**Figura 3.2** Separador magnético de 6 posições para tubos Eppendorf de 1,5 mL



**Figura 3.3** Separador magnético para microplacas de 96 poços

O processo de incubação foi realizado num termoagitador mecânico ThermoMixer modelo F1.5 da Eppendorf (Hamburgo, Alemanha) (figura 3.4).



**Figura 3.4** Termoagitador mecânico ThermoMixer, Eppendorf

## **3.5. Procedimento**

### **3.5.1. Imobilização do anticorpo primário nas partículas magnéticas funcionalizadas – Preparação do complexo MBs-PrG-mAb1**

A preparação do complexo MBs-PrG-mAb1 seguiu o protocolo apresentado no Apêndice 1. Após a ressuspensão das partículas magnéticas no frasco comercial, o volume correspondente a 1,5 mg de MBs-PrG foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL, o sobrenadante foi separado magneticamente e as partículas magnéticas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS 0,1 M pH 7.4. Após a lavagem, e tendo em conta a capacidade de captura das partículas magnéticas (8 µg de anticorpo/mg de MBs-PrG) e a concentração do anticorpo (1 mg/mL), foi adicionado o mAb1 e 200 µL de PBS 0,1 M pH 7.4. A mistura foi incubada à temperatura ambiente, durante 10 min, com agitação, para obtenção das partículas magnéticas modificadas com o anticorpo (complexo MBs-PrG-mAb1). À separação magnética do sobrenadante, seguiram-se 3 lavagens com PBS 0,1 M pH 7.4, a ressuspensão em 1 mL de PBS 0,1 M pH 7.4 e a conservação a 4 °C até à sua utilização. A solução final de trabalho, obtida por diluição da suspensão anterior, apresentava a concentração de 200 µg MBs-PrG-mAb1/mL.

### **3.5.2. Realização do ensaio mpEIA**

O ensaio mpEIA, já anteriormente otimizado, foi realizado por um processo laboratorial manual, com leitura espectrofotométrica de absorvância a 450 nm, utilizando microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo plano (figura 1.7) e um separador magnético (figura 3.3) para permitir a retenção das partículas magnéticas modificadas em cada poço da placa (ver Apêndice 1 – Protocolo experimental).

Por forma a evitar adsorção não específica, os poços da microplaca foram bloqueados com o tampão não proteico “Pierce® Protein-Free”, durante cerca de 12 horas, à temperatura ambiente. Depois da remoção da solução “Protein-Free”, adicionaram-se 25 µL do complexo MBs-PrG-mAb1, na concentração de 200 µg MBs-PrG-mAb1/mL, a cada poço e 100 µL de BSA a 4% para bloquear os locais de ligação ainda livres na superfície das partículas magnéticas. Após incubação da placa durante 60 min à temperatura ambiente, foram adicionados 25 µL de amostra e realizada nova incubação por 60 min, à temperatura ambiente e com agitação suave. Por fim, adicionaram-se 25 µL do anticorpo secundário (Ab2-HRP), numa concentração de 1 µg/mL, a cada poço e

realizada nova incubação, igualmente por 60 min, à temperatura ambiente e com agitação suave.

Entre cada passo de incubação, os poços da placa foram lavados com 300  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato e o sobrenadante removido por ação do campo magnético externo, gerado pelo separador magnético de suporte à microplaca (figura 3.5), que permitiu a retenção das partículas magnéticas modificadas no interior dos poços.

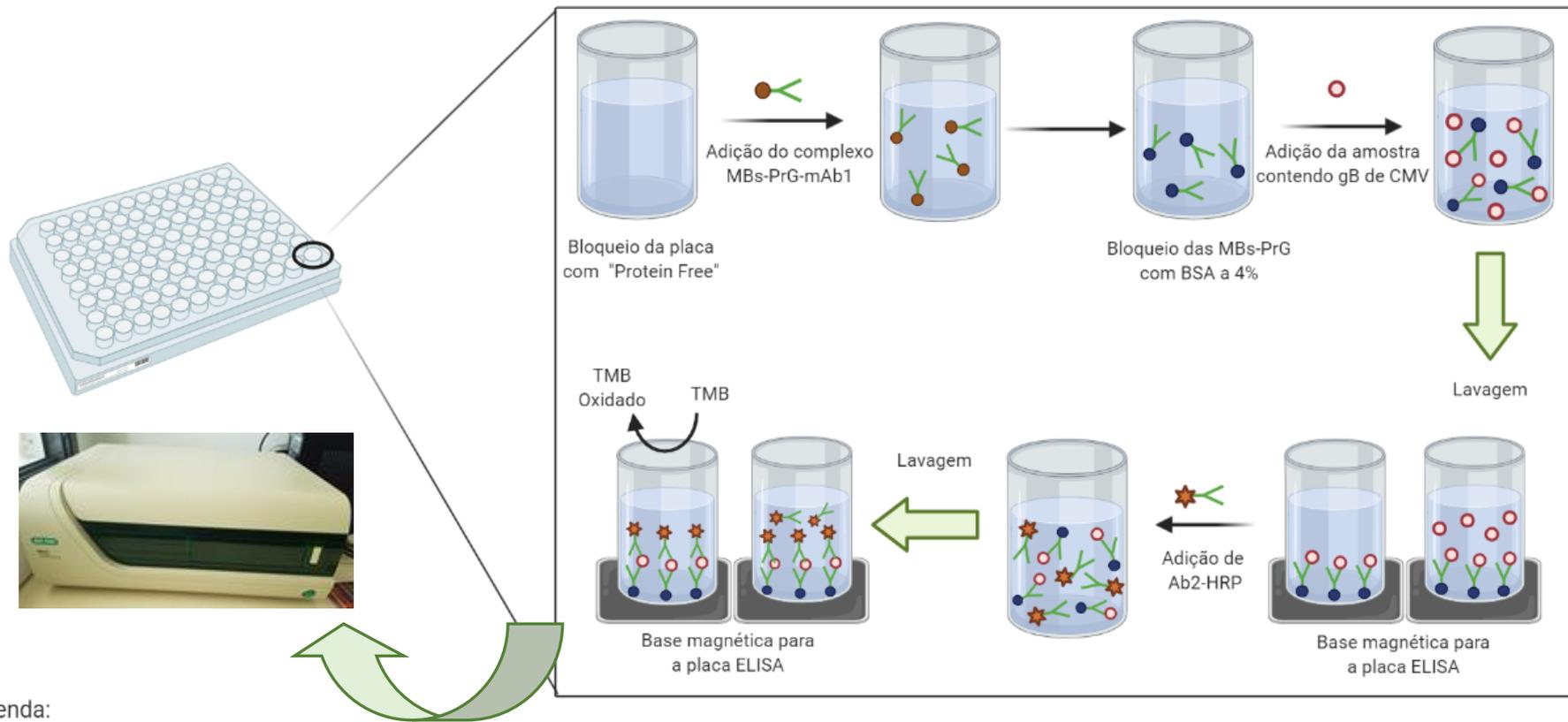


**Figura 3.5** Microplaca de 96 poços adaptada ao separador magnético

Para permitir a leitura espectrofotométrica do ensaio, foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de solução TMB, substrato da enzima peroxidase, a cada poço, e a reação decorreu durante 10 min à temperatura ambiente e com agitação suave, tendo sido parada pela adição de 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5 M.

A leitura espectrofotométrica foi realizada num leitor de microplacas (figura 3.1).

Na figura 3.6 encontra-se a representação esquemática do procedimento experimental realizado.



Legenda:

-  Anticorpo primário conjugado com partículas magnéticas funcionalizadas (MBs-PrG-mAb1)
-  Glicoproteína B de CMV
-  Anticorpo secundário marcado com enzima HRP (Ab2-HRP)

**Figura 3.6** Representação esquemática do imunoenensaio experimental realizado - mpEIA "sandwich"



## 3.6. Metodologias

### 3.6.1. Cálculo de Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo e Valor Preditivo Negativo

A sensibilidade (S) de um teste avalia a sua capacidade para classificar corretamente um resultado como positivo, ou seja, expressa a probabilidade de um teste dar positivo na presença de doença. Por outras palavras, é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os doentes [100, 101]:

$$S = a / (a + c)$$

a – n° de verdadeiros positivos

c – n° de falsos negativos

Utilizando o pressuposto anterior, a sensibilidade da técnica experimental foi calculada, para diferentes valores de “cut-off” teóricos, definindo a e c como:

- a = amostras CMV positivas\* pela técnica de referência e com resultado de absorvância superior ao valor de “cut-off” teórico definido

- c = amostras CMV positivas\* pela técnica de referência e com resultado de absorvância inferior ao valor de “cut-off” teórico definido

(\*amostras com um resultado de “Detetável” para pesquisa de CMV por RT-PCR)

A especificidade (E), por outro lado, avalia a capacidade de um teste para classificar corretamente um resultado como negativo, ou seja, é a probabilidade de um teste dar negativo na ausência de doença, e pode ser definida como a proporção de verdadeiros negativos entre todos os não doentes [100, 101]:

$$E = b / (b + d)$$

b – n° de verdadeiros negativos

d – n° de falsos positivos

Para o cálculo da especificidade da técnica experimental, definiram-se  $\underline{b}$  e  $\underline{d}$  como:

- $\underline{b}$  = amostras CMV negativas\* pela técnica de referência e com resultado de absorvância inferior ao valor de “cut-off” teórico definido
- $\underline{d}$  = amostras CMV negativas\* pela técnica de referência e com resultado de absorvância superior ao valor de “cut-off” teórico definido

(\*amostras com um resultado de “Não Detetável” para pesquisa de CMV por RT-PCR)

A sensibilidade e a especificidade são parâmetros importantes na avaliação de um novo teste de diagnóstico, uma vez que nos dão indicação do seu desempenho, quando comparado com um teste de referência existente. Estas duas medidas são independentes entre si e inversamente proporcionais. De uma forma geral, quando um teste ganha em sensibilidade, perde em especificidade e *vice-versa*. Um teste muito sensível dificilmente deixará de diagnosticar indivíduos com a doença, sendo útil para excluir a doença quando a pessoa testa negativo, enquanto que um teste muito específico dificilmente identificará como doente um indivíduo não-doente, sendo útil para incluir a doença quando a pessoa testa positivo [101, 102].

O valor preditivo positivo (VPP) é a percentagem de indivíduos com teste positivo e que, efetivamente, apresentam a doença, ou seja, é a proporção de verdadeiros positivos entre todos os indivíduos com teste positivo [100, 101]:

$$\text{VPP} = a / (a + d)$$

a – n° de verdadeiros positivos

d – n° de falsos positivos

Com  $\underline{a}$  e  $\underline{d}$  definidos no ponto 3.6.1.

O valor preditivo negativo (VPN) é a percentagem de indivíduos com teste negativo e que, efetivamente, não apresentam a doença, ou seja, é a proporção de verdadeiros negativos entre todos os indivíduos com teste negativo [100, 101]:

$$\text{VPN} = b / (b + c)$$

b – n° de verdadeiros negativos

c – n° de falsos negativos

Com b e c definidos no ponto 3.6.1.

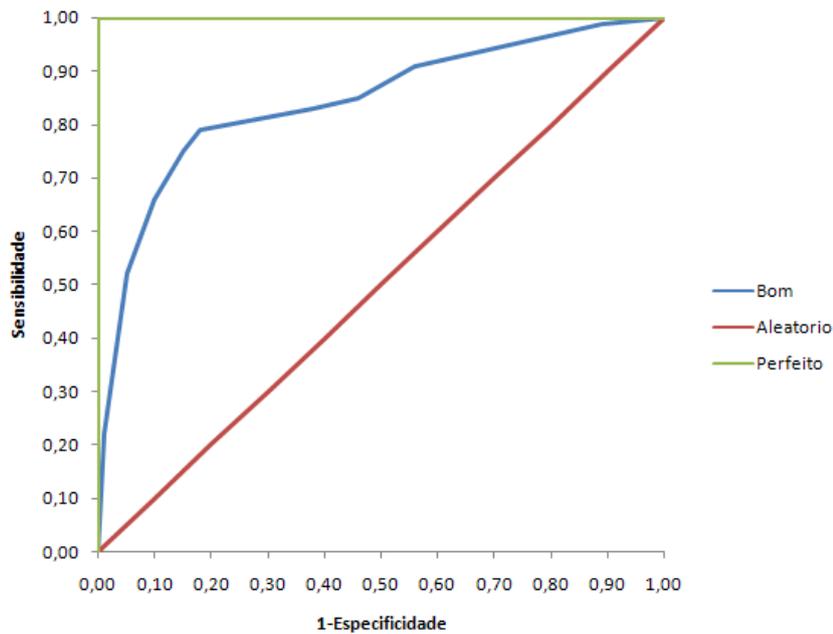
Na avaliação de desempenho de um novo teste, os valores preditivos assumem uma grande importância, uma vez que indicam a probabilidade de, perante um resultado positivo ou negativo, existir ou não doença. O VPP diz-nos quantos dos indivíduos que testaram positivo são verdadeiros positivos, e quanto mais próximo de 100% estiver o resultado, melhor é o desempenho do teste. Por outro lado, o VPN diz-nos quantos dos indivíduos que testaram negativo são verdadeiros negativos e pretende-se, também, que o resultado seja o mais próximo possível de 100% [101].

### **3.6.2. Avaliação do “Cut-off” – Curva de ROC**

Na prática clínica é essencial que se consiga estabelecer um diagnóstico assertivo, e tão breve quanto possível, que permita o tratamento adequado do doente. Para isso, os clínicos têm à sua disposição um grande número de testes e exames de diagnóstico que suplementam a história do doente e a examinação clínica. No entanto, nem todos os testes de diagnóstico são iguais e é preciso conhecer as suas características, qualidades, limitações e o tipo de informação que podem fornecer. De uma forma simplista, podemos dizer que o que o clínico pretende saber é se uma determinada condição está ou não presente, o que pode não ser linear uma vez que os testes de diagnóstico nem sempre dão uma resposta do tipo sim ou não, mas antes um resultado numa determinada escala. Nestes casos, um dos desafios que se impõe é a seleção de um valor de “cut-off”, ou seja, um valor que permita distinguir um resultado presumivelmente positivo de um resultado presumivelmente negativo (o “cut-off” é o valor a partir do qual um resultado será considerado positivo), para além da sensibilidade e especificidade da técnica [103].

Uma metodologia comum para a determinação do valor de “cut-off” de uma técnica, e à qual se recorreu neste trabalho, é a construção de curva ROC (“Receiving Operating Characteristic”), que consiste em definir diferentes valores de “cut-off” teóricos e, para cada um deles, identificar o número de resultados verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos [103-105], de acordo com o que foi definido nos pontos 3.6.1 e 3.6.2. Assim, para cada valor teórico de “cut-off” definido, obtém-se um valor de sensibilidade e de especificidade, o que essencialmente resulta numa lista de resultados aos quais correspondem valores específicos de sensibilidade e especificidade.

A representação gráfica figura 3.7 esquematiza uma curva ROC, que se obtém com a sensibilidade (fração de verdadeiros positivos) no eixo das ordenadas e 1-especificidade (fração de falsos positivos) no eixo das abcissas, permitindo definir um valor de “cut-off”, com o qual se consiga o melhor compromisso entre a sensibilidade e a especificidade, e a capacidade discriminativa da técnica para avaliar a condição/doença em estudo. A figura 3.7 mostra três exemplos de curvas ROC com diferente capacidade discriminativa.



**Figura 3.7** Exemplos de curvas ROC para técnicas com diferente capacidade discriminativa (Retirado de referência [106])

No presente trabalho foi avaliada a presença do agente infeccioso CMV em amostras biológicas por um imunensaio mpEIA “sandwich”, metodologia que está na base de funcionamento de um imunossensor eletroquímico, que se pretende validar como método de diagnóstico de infecção por CMV. Nesse sentido, e com os resultados obtidos, em conjunto com o conhecimento prévio relativamente à presença ou ausência de CMV nas amostras analisadas (resultados obtidos pela técnica molecular de referência RT-PCR), foi determinado o valor de “cut-off” da técnica recorrendo ao método de construção de curva ROC.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização das Amostras Biológicas Utilizadas

As amostras utilizadas estavam caracterizadas em termos de produto biológico e resultado para pesquisa de CMV por PCR (laboratório de origem – SYNLAB Health II). Os resultados são apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2. Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram um resultado de “Detetável” para a pesquisa de CMV e amostras negativas aquelas que apresentaram um resultado de “Não Detetável”.

**Tabela 4.1** Caracterização das amostras utilizadas e resultado obtido para pesquisa de CMV pela técnica de referência RT-PCR

<b>Nº Amostra</b>	<b>Produto</b>	<b>Resultado para CMV (RT-PCR)</b>
1	Plasma EDTA	Não Detetável
2	OP	Não Detetável
3	OP	Não Detetável
4	OP	Detetável
5	Plasma EDTA	Não Detetável
6	Plasma EDTA	Não Detetável
7	Plasma EDTA	Detetável (1421 UI/mL)
8	Plasma EDTA	Não Detetável
9	Plasma EDTA	Não Detetável
10	Plasma EDTA	Detetável (1770 UI/mL)
11	Plasma EDTA	Não Detetável
12	Plasma EDTA	Não Detetável
13	Plasma EDTA	Detetável (2430 UI/mL)
14	OP	Não Detetável
15	OP	Não Detetável
16	Secreções	Detetável
17	Líquido Amniótico	Não Detetável
18	Líquido Amniótico	Não Detetável
19	Leite Materno	Detetável
20	Urina	Não Detetável
21	Urina	Não Detetável
22	Urina	Não Detetável
23	Urina	Não Detetável
24	Urina	Não Detetável

**Tabela 4.2** Caracterização das amostras utilizadas e resultado obtido para pesquisa de CMV pela técnica de referência RT-PCR (Continuação)

<b>Nº Amostra</b>	<b>Produto</b>	<b>Resultado para CMV (RT-PCR)</b>
25	Plasma EDTA	Não Detetável
26	Plasma EDTA	Detetável
27	Urina	Detetável
28	Plasma EDTA	Detetável
29	Plasma EDTA	Detetável
30	LBA	Detetável
31	OP	Não Detetável
32	Urina	Não Detetável
33	Urina	Não Detetável
34	Urina	Não Detetável
35	Urina	Não Detetável
36	Urina	Não Detetável
37	Urina	Não Detetável
38	Plasma EDTA	Não Detetável
39	Urina	Não Detetável
40	Urina	Não Detetável
41	Urina	Não Detetável
42	Urina	Não Detetável
43	Urina	Não Detetável
44	Plasma EDTA	Não Detetável
45	Plasma EDTA	Não Detetável
46	Urina	Não Detetável
47	Urina	Não Detetável
48	Plasma EDTA	Não Detetável
49	Plasma EDTA	Não Detetável
50	Urina	Não Detetável
51	Urina	Não Detetável
52	Urina	Não Detetável
53	Plasma EDTA	Não Detetável
54	Urina	Detetável

Legenda das tabelas 4.1 e 4.2:

LBA – Lavado Bronco-Alveolar  
 LCR – Líquido Cefalorraquidiano  
 OP – Outro Produto

 Amostras Positivas para CMV por RT-PCR

 Amostras Negativas para CMV por RT-PCR

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (utilizado como anticoagulante)

As amostras para as quais não foi definido o produto biológico de origem, aquando do registo do pedido analítico, apresentavam a indicação de OP – Outro Produto. No entanto, o laboratório de origem informou-nos que se tratavam, maioritariamente, de LCR's.

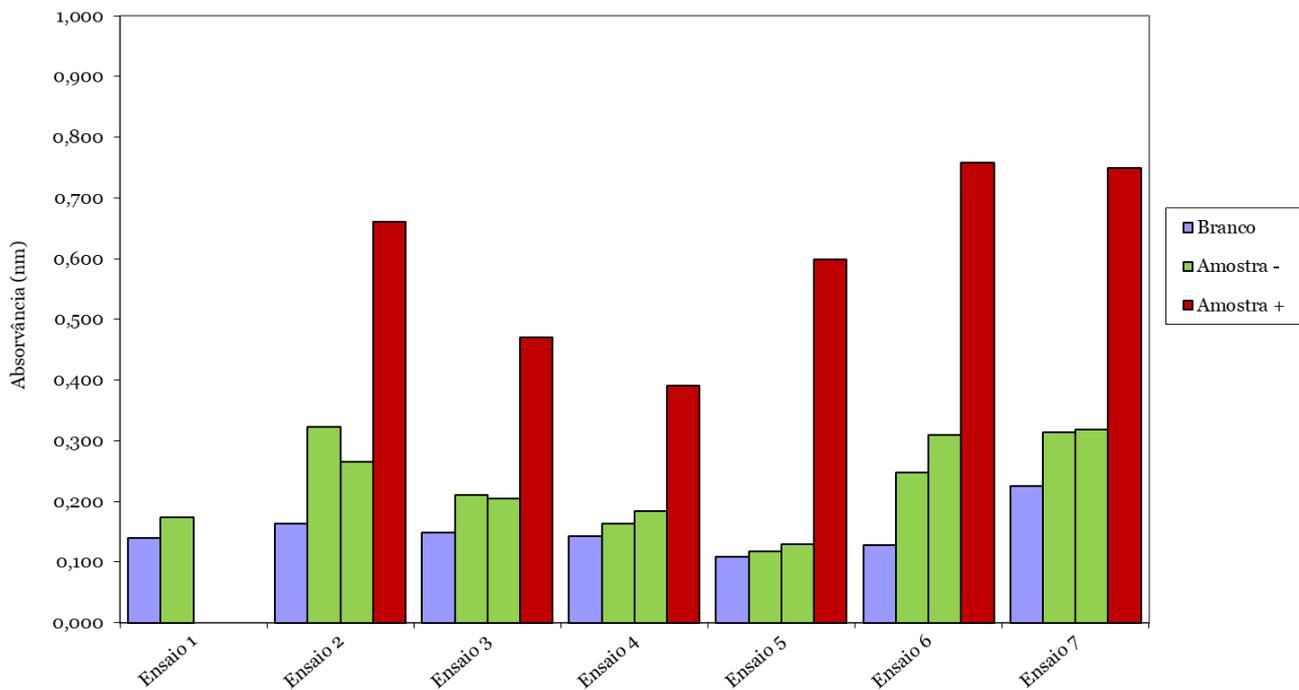
## 4.2. Resultados Obtidos

Os resultados das absorvâncias obtidas por mpEIA foram os evidenciados na tabela 4.3 e nas figuras 4.1 a 4.3. A tabela 4.3 apresenta os resultados experimentais das amostras 1 a 54 e o respetivo valor do branco de cada ensaio experimental (ensaios 1 a 9).

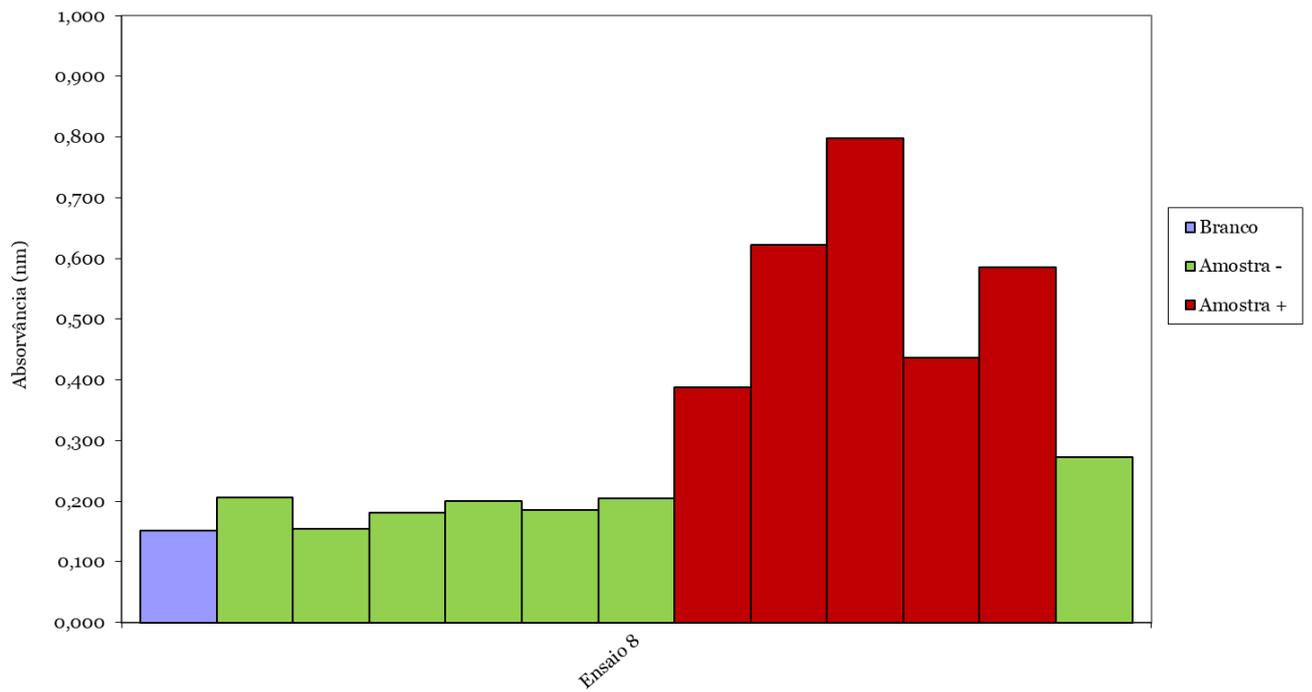
**Tabela 4.3** Resultados obtidos para a absorvância (nm) das amostras pela técnica mpEIA

Amostra	Absorvância (nm)		Amostra	Absorvância (nm)	
	Amostra	Branco		Amostra	Branco
1	0,173	0,139 (Ensaio 1)	28	0,798	0,151 (Ensaio 8)
2	0,323	0,164 (Ensaio 2)	29	0,436	
3	0,265		30	0,585	
4	0,661	0,148 (Ensaio 3)	31	0,272	0,133 (Ensaio 9)
5	0,211		32	0,220	
6	0,204		33	0,231	
7	0,471	0,142 (Ensaio 4)	34	0,181	
8	0,163		35	0,243	
9	0,184		36	0,182	
10	0,391	0,109 (Ensaio 5)	37	0,201	
11	0,118		38	0,158	
12	0,130		39	0,211	
13	0,599	0,128 (Ensaio 6)	40	0,190	
14	0,248		41	0,186	
15	0,309		42	0,201	
16	0,758	0,226 (Ensaio 7)	43	0,166	
17	0,314		44	0,186	
18	0,318		45	0,169	
19	0,749	0,151 (Ensaio 8)	46	0,153	
20	0,206		47	0,241	
21	0,155		48	0,156	
22	0,181		49	0,197	
23	0,200		50	0,198	
24	0,185		51	0,210	
25	0,204		52	0,181	
26	0,387		53	0,180	
27	0,622		54	1,383	

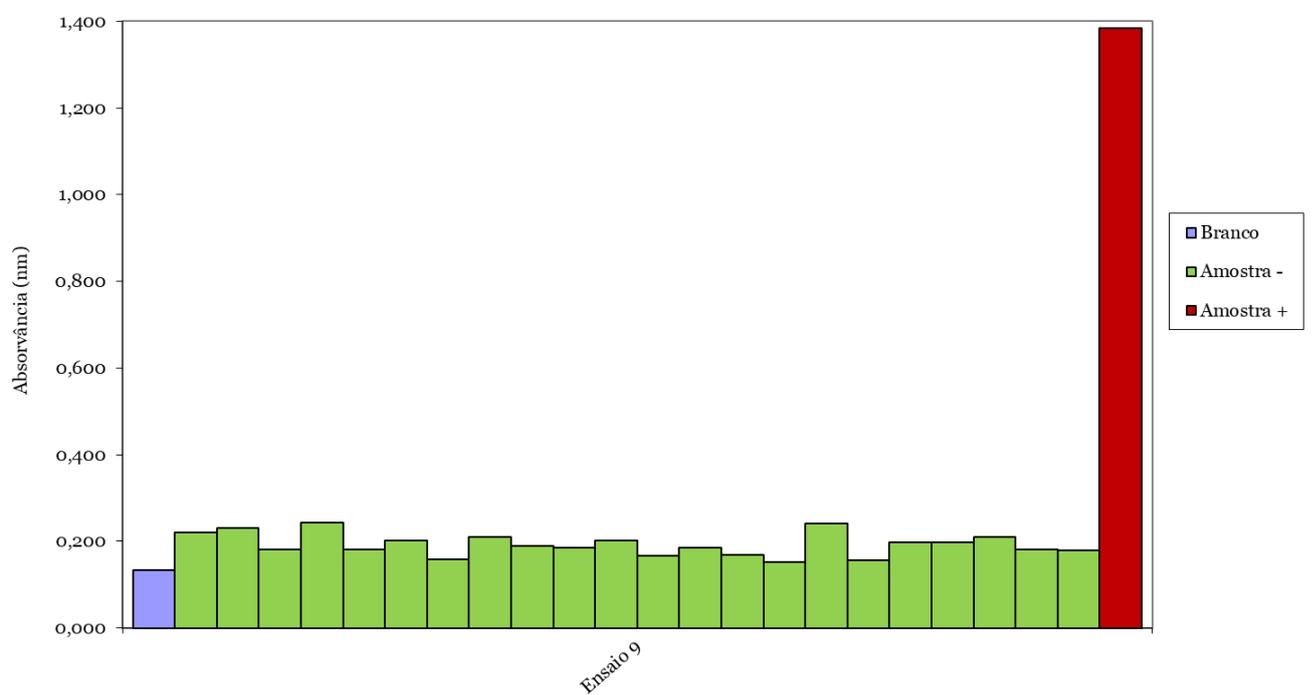
Para uma melhor percepção das diferenças encontradas nos resultados das amostras positivas e negativas, em relação ao branco, optou-se pela representação gráfica dos mesmos (figuras 4.1 a 4.3), considerando cada ensaio experimental separadamente.



**Figura 4.1** Representação gráfica das absorvâncias das amostras obtidas por mpEIA nos ensaios 1 a 7 (amostras 1 a 19)



**Figura 4.2** Representação gráfica das absorvâncias das amostras obtidas por mpEIA no ensaio 8 (amostras 20 a 31)



**Figura 4.3** Representação gráfica das absorvâncias das amostras obtidas por mpEIA no ensaio 9 (amostras 32 a 54)

Analisando a tabela 4.3 e as figuras 4.1 a 4.3 verifica-se que, em todos os ensaios realizados, os resultados obtidos para as absorvâncias das amostras negativas são sempre ligeiramente superiores aos do branco e consideravelmente inferiores às absorvâncias das amostras positivas.

Tendo em conta o diferente tipo de amostras utilizadas (urina, plasma EDTA, etc – tabelas 4.1 e 4.2) e os resultados obtidos, tentámos perceber se existia alguma tendência nos valores das absorvâncias para os diferentes produtos biológicos, tendência essa que pudesse ser indicativa da influência da matriz da amostra. Para isso, agrupamos os resultados das amostras negativas em função do produto biológico, depois de retirado o valor do branco do ensaio experimental. Os resultados são apresentados nas tabelas 4.4 e 4.5 e na figura 4.4.

**Tabela 4.4** Resultados obtidos para a absorvância (nm) das amostras pela técnica mpEIA após descontar o valor do branco do ensaio experimental

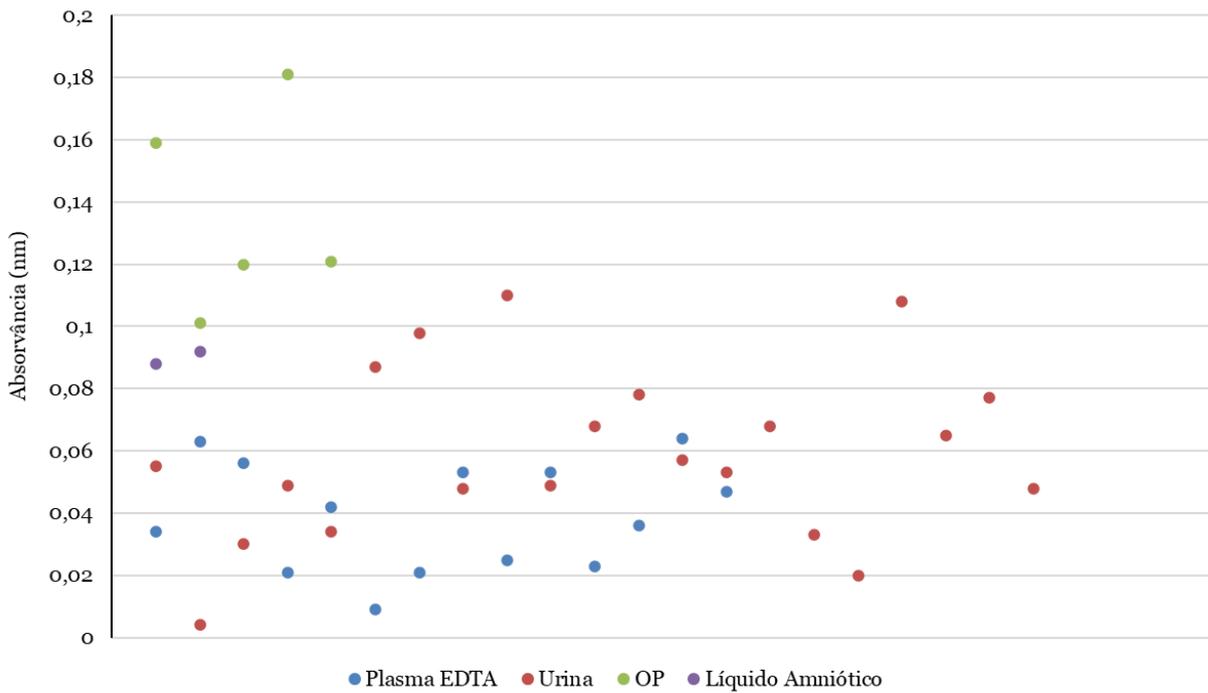
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)
1	0,034	19	0,523	37	0,068
2	0,159	20	0,055	38	0,025
3	0,101	21	0,004	39	0,078
4	0,497	22	0,030	40	0,057
5	0,063	23	0,049	41	0,053
6	0,056	24	0,034	42	0,068
7	0,323	25	0,053	43	0,033
8	0,021	26	0,236	44	0,053
9	0,042	27	0,471	45	0,036
10	0,249	28	0,647	46	0,020
11	0,009	29	0,285	47	0,108
12	0,021	30	0,434	48	0,023
13	0,490	31	0,121	49	0,064
14	0,120	32	0,087	50	0,065
15	0,181	33	0,098	51	0,077
16	0,630	34	0,048	52	0,048
17	0,088	35	0,110	53	0,047
18	0,092	36	0,049	54	1,250

 Amostras Positivas para CMV por RT-PCR

**Tabela 4.5** Resultados de absorvância (nm) obtidos para as amostras negativas considerando o produto biológico da amostra

Produto	Absorvância (nm)	Produto	Absorvância (nm)	Produto	Absorvância (nm)
Plasma EDTA	0,034 (1)	Urina	0,055 (20)	OP	0,159 (2)
	0,063 (5)		0,004 (21)		0,101 (3)
	0,056 (6)		0,030 (22)		0,120 (14)
	0,021 (8)		0,049 (23)		0,181 (15)
	0,042 (9)		0,034 (24)		0,121 (31)
	0,009 (11)		0,087 (32)	Líquido Amniótico	0,088 (17)
	0,021 (12)		0,098 (33)		0,092 (18)
	0,053 (25)		0,048 (34)		
	0,025 (38)		0,110 (35)		
	0,053 (44)		0,049 (36)		
	0,036 (45)		0,068 (37)		
	0,023 (48)		0,078 (39)		
	0,064 (49)		0,057 (40)		
	0,047 (53)		0,053 (41)		
	0,068 (42)				
	0,033 (43)				
	0,020 (46)				
	0,108 (47)				
	0,065 (50)				
	0,077 (51)				
	0,048 (52)				

(Nº da amostra)



**Figura 4.4** Resultados de absorvância (nm) obtidos para as amostras negativas, considerando o produto biológico da amostra

Pela análise da figura 4.4 é possível verificar que as amostras identificadas como OP, que corresponde a “Outro Produto”, apresentam um resultado de absorvância tendencialmente superior às restantes. Tratando-se, como sabemos, maioritariamente de LCR’s, coloca-se a questão se haverá algum constituinte deste produto biológico que possa estar a produzir interações não específicas, induzidas pelas forças de tensão, características das interações hidrofóbicas, que se estabelecem no meio reacional. Sabe-se que a adição de pequenas quantidades de um detergente, por exemplo Tween-20, reduz a tensão superficial e, conseqüentemente, este tipo de interações [107].

### 4.3. Determinação do Valor de “Cut-off”

Utilizando as metodologias apresentadas no ponto 3.6, foram definidos valores de “cut-off” teóricos entre 0,000 e 0,450 nm e, para cada um deles, determinou-se o número de amostras verdadeiras positivas, verdadeiras negativas, a sensibilidade e a especificidade.

Os respectivos resultados são apresentados na tabela 4.6, a título de exemplo, para um valor de “cut-off” teórico definido de 0,025 nm. Para os restantes valores de “cut-off” optou-se por apresentar as tabelas no Apêndice 2, facilitando a análise dos resultados.

**Tabela 4.6** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,025 nm

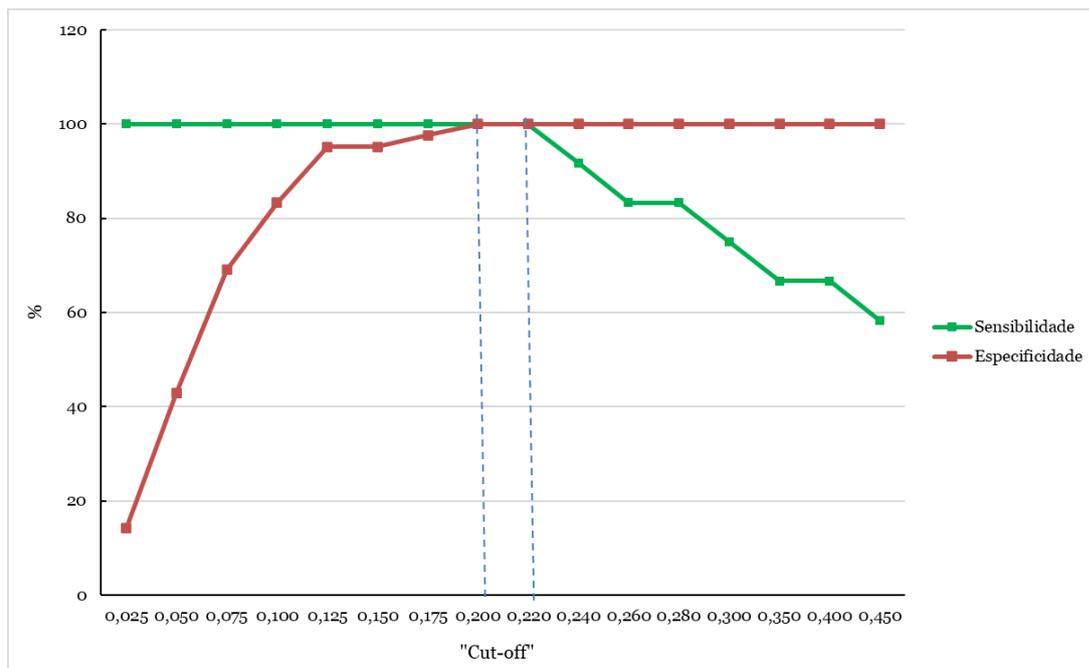
Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas		S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	8	0,021	100% (12/12)	14,3% (6/42)
7	0,323	11	0,009		
10	0,249	12	0,021		
13	0,490	21	0,004		
16	0,630	46	0,020		
19	0,523	48	0,023		
26	0,236				
27	0,471				
28	0,647				
29	0,285				
30	0,434				
54	1,250				
Total = 12 Amostras		Total = 6 Amostras			

Os resultados de sensibilidade e especificidade para cada valor de “cut-off” definido (calculados como descrito anteriormente), foram os evidenciados na tabela 4.7.

**Tabela 4.7** Valores de “cut-off” teóricos definidos e correspondente sensibilidades e especificidades obtidas

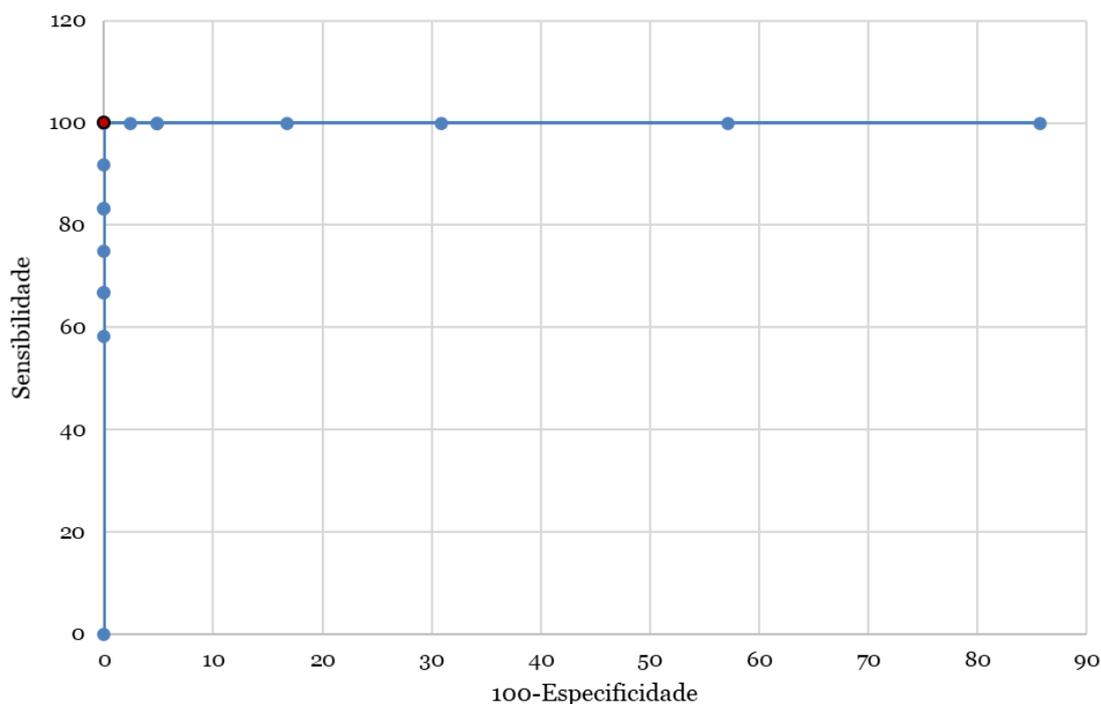
“Cut-off”	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
0,025	100	14,3
0,050	100	42,9
0,075	100	69,1
0,100	100	83,3
0,125	100	95,2
0,150	100	95,2
0,175	100	97,6
<b>0,200</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>0,220</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
0,240	91,7	100
0,260	83,3	100
0,280	83,3	100
0,300	75,0	100
0,350	66,7	100
0,400	66,7	100
0,450	58,3	100

Verifica-se, pela análise da tabela 4.7 e da figura 4.5, que a especificidade se mantém estável entre os valores de 0,200-0,450 e a maior sensibilidade é obtida com o “cut-off” entre 0,200-0,220.



**Figura 4.5** Representação gráfica da sensibilidade e da especificidade para cada valor de “cut-off” teórico definido

Utilizando a metodologia associada às curvas de ROC, e os dados da tabela 4.7, construiu-se o gráfico apresentado na figura 4.6. O ponto mais próximo do canto superior esquerdo representa o melhor compromisso entre a sensibilidade e a especificidade, fornecendo o valor de “cut-off” ótimo da técnica.



**Figura 4.6** Representação gráfica da curva ROC obtida para a determinação do valor de “cut-off” da técnica mpEIA utilizada na detecção de CMV

A análise da curva ROC apresentada na figura 4.6 e da tabela 4.7 permite estabelecer o valor de 0,200 nm (●) como sendo o “cut-off” ótimo para o imunoenensaio mpEIA aqui apresentado. Para este valor de “cut-off”, o método apresenta valores de 100% tanto para a sensibilidade como para a especificidade.

O mesmo tipo de abordagem, definida no ponto 3.6, foi seguida para o cálculo do valor preditivo positivo e do valor preditivo negativo, parâmetros importantes na avaliação de desempenho de um novo teste, tendo sido obtidos resultados também de 100% para ambos, para o valor de “cut-off” ótimo estabelecido.

Muito embora os resultados obtidos fossem os ideais para qualquer metodologia analítica, o número de amostras positivas testado foi reduzido, o que influencia a determinação destes valores que são, no entanto, muito promissores. É, portanto, necessário alargar a população de amostras.



## 5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Qualquer trabalho de investigação, vai evoluindo à medida que as experiências decorrem, e os passos seguintes têm por base os achados dos que os antecedem, tendo sempre presentes os objetivos iniciais definidos.

Este trabalho pretendeu dar início à validação de um imunossensor, construído com base num imunoensaio do tipo mpEIA, avaliando a sua aplicabilidade a amostras biológicas. Nesta primeira fase as amostras foram analisadas pela metodologia experimental mpEIA anteriormente otimizada pelo grupo de investigação, sem que fosse utilizado o dispositivo em si, com o objetivo de confirmar a viabilidade e qualidade desta técnica para o diagnóstico de infeção por CMV.

Tendo em conta o número reduzido de amostras a que tivemos acesso, sobretudo positivas, e a influência que isso tem, quer na avaliação da qualidade do método, definida em termos de sensibilidade, especificidade e valor de “cut-off”, quer na sua aplicabilidade na prática clínica, um dos principais caminhos a seguir será a continuidade da mesma linha de trabalho, aumentando o número de amostras analisadas, o que permitirá obter resultados mais fidedignos.

Com um maior número de amostras será também possível realizar estudos para avaliar a interferência da matriz da amostra, relativamente a interações não específicas, e encontrar formas de a minimizar ou mesmo eliminar.

Não menos importante, seria também a avaliação da correlação entre os resultados obtidos por mpEIA e a carga viral da amostra, sendo para isso necessário conhecer esse valor para um considerável número de amostras (das 12 amostras positivas testadas, apenas 3 tinham o valor da carga viral associado).

Por fim, será essencial utilizar o dispositivo propriamente dito para processar diferentes tipos de amostras biológicas e, assim, concluir o processo de validação do imunossensor eletroquímico, fundamentado no imunoensaio enzimático baseado em partículas magnéticas.



## 6. Referências Bibliográficas

1. Forbes, B. A., Sahm, D. F., Weissfeld, A. S. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 12<sup>th</sup> Edition, Mosby Elsevier, (2007).
2. Ferreira, W. C., Sousa, J. C. Microbiologia – Volume 3. Lidel Ed., (2002).
3. Prescott, L. M. Prescott-Harley-Klein: Microbiology. 5<sup>th</sup> Edition, McGraw-Hill Companies, (2002).
4. Acheson, N. H. Fundamentals of Molecular Virology. 2<sup>nd</sup> Edition, John Wiley & Sons Inc., (2011).
5. Adams, M. J., Lefkowitz, E. J., King, A. M. Q., Carstens, E. B. Recently agreed changes to the International Code of Virus Classification and Nomenclature. *Arch Virol*, 2013, 158: 2633-2639.
6. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaüer, M. A. Medical Microbiology. 5<sup>th</sup> Edition, Elsevier Inc., (2005).
7. Stevens, J. G. Human herpesviruses: a consideration of the latent state. *Microbiol Rev*, 1989, 53(3): 318–332.
8. Christensen, T. Human Herpesviruses in MS. *Int MS J*, 2007, 14: 41–47.
9. Slobedman, B., Mocarski, E. Quantitative Analysis of Latent Human Cytomegalovirus. *J Virol*, 1999, 73(6): 4806-4812.
10. Dunn, W., Chou, C., Li, H., Hai, R., Patterson, D., Stolc, V., Zhu, H., Liu, F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *PNAS*, 2003, 100(24): 14223-14228.
11. Limaye, A. P., Kirby, K. A., Rubenfeld, G. D., Leisenring, W. M., Bulger, E. M., Neff, M. J., Gibran, N. S., Huang, M-L., Santo, T. K., Corey, L., Boeckh, M. Cytomegalovirus Reactivation in Critically-Ill Immunocompetent Patients. *JAMA*, 2008, 300(4): 413-422.
12. Filipa Andreia Velez Pires. Construction of an immunosensor for human cytomegalovirus infection diagnosis. Tese para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, 2019, Universidade da Beira Interior, Covilhã.
13. Gámez, S. S., Ruiz, M. P., Marí, J. M. N. Infección por citomegalovirus humano. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2014, 32(1): 15-22.

14. Revello, M. G., Gerna, G. Diagnosis and Management of Human Cytomegalovirus Infection in the Mother, Fetus, and Newborn Infant. *Clin. Microbiol Rev*, 2002, 15(4): 680–715.
15. Pires, F., Silva, H., Domínguez-Renedo, O., Alonso-Lomillo, M. A., Arcos-Martínez, M. J., Dias-Cabral, A. C. Disposable immunosensor for human cytomegalovirus glycoprotein B detection. *Talanta*, 2015, 136: 42–46.
16. Liu, G., Hai, R., Liu, F. Detection of congenital cytomegalovirus in newborns using nucleic acid amplification techniques and its public health implications. *Virologica Sinica*, 2017, 32(5): 376-386.
17. Tavares, M. V., Domingues, A. P., Tavares, M., Malheiro, E., Tavares, F., Moura, P. CITOMEGALOVÍRUS Existe Lugar para o Rastreo Durante a Gravidez?. *Acta Med Port*, 2011, 24(S4): 1003-1008.
18. Britt, W.J., Boppana, S. Human cytomegalovirus virion proteins. *Hum Immunol*, 2004, 65: 395-402.
19. Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D., The human cytomegalovirus. *Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 98: 269-297.
20. Yen-Lieberman, B. Diagnosis of Human Cytomegalovirus Disease. *Clin Microbiol Newsl*, 2000, 22(4): 105–109.
21. Boeckh, M., Geballe, A. P. Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest*, 2011, 121(5): 1673–1680.
22. Ho, M. The history of cytomegalovirus and its diseases. *Med Microbiol Immunol*, 2008, 197: 65–73.
23. Collins-McMillen, D., Rak, M., Buehler, J. C., Igarashi-Hayes, S., Kamil, J. P., Moorman, N. J., Goodrum, F. Alternative promoters drive human cytomegalovirus reactivation from latency. *PNAS*, 2019, 116(35): 17492-17497.
24. Cannon, M. J., Schmid, D. S., Hyde, T. B. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Rev Med Virol*, 2010, 20: 202–213.
25. Malm, G., Engman, M-L. Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 2007, 12: 154-159.
26. Junqueira, J. J. M., Sancho, T. M., Santos, V. A. Citomegalovírus: Revisão dos Aspectos Epidemiológicos, Clínicos, Diagnósticos e de Tratamento. *NewsLab*, 2008, 86: 88-104.

27. Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Griffin, D. E. *Fields Virology - Volume 2*. 5<sup>th</sup> Edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, (2007).
28. Martí-Carreras, J., Maes, P. Human cytomegalovirus genomics and transcriptomics through the lens of next-generation sequencing: revision and future challenges. *Virus Genes*, 2019, 55: 138–164.
29. Plafker, S. M., Gibson, W. Cytomegalovirus Assembly Protein Precursor and Proteinase Precursor Contain Two Nuclear Localization Signals That Mediate Their Own Nuclear Translocation and That of the Major Capsid Protein. *J Virol*, 1998, 72(10): 7722–7732.
30. Kalejta, R. F. Tegument Proteins of Human Cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(2): 249-265.
31. Smith, R. M., Kosuri, S., Kerry, J. A. Role of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins in Virion Assembly. *Viruses*, 2014, 6: 582-605.
32. Schleiss, M. R. Recombinant cytomegalovirus glycoprotein B vaccine: Rethinking the immunological basis of protection. *PNAS*, 2018, 115(24): 6110-6112.
33. Griffiths, P., Baraniak, I., Reeves, M. The pathogenesis of human cytomegalovirus. *J Pathol*, 2015, 235: 288–297.
34. Speckner, A., Glykofrydes, D., Ohlin, M., Mach, M. Antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B induces a multitude of different antibodies which, when combined, results in incomplete virus neutralization. *J Gen Virol*, 1999, 80: 2183–2191.
35. Speckner, A., Kropff, B., Knör, S., Mach, M. The antigenic domain 1 of human cytomegalovirus glycoprotein B contains an intramolecular disulphide bond. *J Gen Virol*, 2000, 81: 2659–2663.
36. Pires, F., Arcos-Martínez, M. J., Dias-Cabral, A. C., Vidal, J. C., Castillo, J. R. A rapid magnetic particle-based enzyme immunoassay for human cytomegalovirus glycoprotein B quantification. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 156: 372–378.
37. Compton, T. Receptors and immune sensors: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(1): 5-8.
38. Tandon, R., Mocarski, E. S. Viral and host control of cytomegalovirus maturation. *Trends in Microbiol*, 2012, 20(8): 392-401.
39. Womack, A., Shenk, T. Human Cytomegalovirus Tegument Protein pUL71 is Required for Efficient Virion Egress. *mBio*, 2010, 1(5): e00282-10.

40. Mattes, F. M., McLaughlin, J. E., Emery, V. C., Clark, D. A., Griffiths, P. D. Histopathological detection of owl's eye inclusions is still specific for cytomegalovirus in the era of human herpesviruses 6 and 7. *J Clin Pathol*, 2000, 53: 612–614.
41. Esteves, S. Infecção pelo citomegalovírus durante a gravidez e no recém-nascido. Laboratório Nacional de Referência para Citomegalovírus e Parvovírus B19, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2011.
42. Emery, V.C., Cytomegalovirus: recent progress in understanding pathogenesis and control. *Q J Med*, 2012, 105: 401-405.
43. Peggs, K.S., Mackinnon, S. Cytomegalovirus: the role of CMV post-haematopoietic stem cell transplantation. *Int J Biochem & Cell Biol*, 2004, 36: 695-701.
44. Enders, G., Daiminger, A., Bäder, U., Exler, S., Enders, M. Intrauterine transmission and clinical outcome of 248 pregnancies with primary cytomegalovirus infection in relation to gestational age. *J Clin Virol*, 2011, 52: 244–246.
45. Bissinger, A. L., Sinzger, C., Kaiserling, E., Jahn, G. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: Correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J Med Virol*, 2002, 67(2): 200– 206.
46. Sinzger, C., Jahn, G. Human Cytomegalovirus Cell Tropism and Pathogenesis. *Intervirology*, 1996, 39(5-6): 302–319.
47. Sinclair, J., Sissons, P. Latent and Persistent infections of monocytes and macrophages. *Intervirology*, 1996, 39: 293–301.
48. Streblow, D. N., Nelson, J. A. Models of HCMV latency and reactivation. *Trends Microbiol*, 2003, 11(7): 293–295.
49. Shenk, T. E., Stinski, M. F. Human Cytomegalovirus. Springer-Verlag, (2008).
50. Swanson, E. C., Schleiss, M. R. Congenital Cytomegalovirus Infection: New Prospects for Prevention and Therapy. *Pediatr Clin North Am*, 2013, 60(2): 1-17.
51. Friel, T. J. Epidemiology, clinical manifestations, and treatment of cytomegalovirus infection in immunocompetent hosts. *Wolters Kluwer*, 2012.
52. Naing, Z. W., Scott, G. M., Shand, A., Hamilton, S. T., van Zuylen, W. J., Basha, J., Hall, B., Craig, M. E., Rawlinson, W. D. Congenital cytomegalovirus infection in

- pregnancy: A review of prevalence, clinical features, diagnosis and prevention. *Aust NZ J Obstet Gynaecol*, 2016, 56(1): 9–18.
53. Hurt, C., Tammaro, D. Diagnostic Evaluation of Mononucleosis-Like Illnesses. *Am J Med*, 2007, 120: 911.e1-911.e8.
  54. Duff, P. Diagnosis and Management of CMV Infection in Pregnancy. *Perinatology*, 2010, 1: 1-6.
  55. Lazzarotto, T., Guerra, B., Gabrielli, L., Lanari, N., Landini, M. P. Update on the prevention, diagnosis and management of cytomegalovirus infection during pregnancy. *Clin Microbiol Infect*, 2011, 17(9): 1285-1293.
  56. Walker, S.P., Palma-Dias, R., Wood, E. M., Shekleton, P., Giles, M. L. Cytomegalovirus in pregnancy: to screen or not to screen. *BMC Pregnancy Childbirth*, 2013, 13: 96.
  57. Johnson, J., Anderson, B., Pass, R. F. Prevention of maternal and congenital cytomegalovirus infection. *Clin Obstet Gynecol*, 2012, 55(2): 521-530.
  58. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. J. Immunobiology: The immune system in health and disease. 5<sup>th</sup> Edition, Garland Science, (2001).
  59. Demmler-Harrison, G. J. Congenital cytomegalovirus: Public health action towards awareness, prevention, and treatment. *J Clin Virol*, 2009, 46S: 1–5.
  60. Leung, A. K. C., Sauve, R. S., Davies, H. D. Congenital cytomegalovirus infection. *J Natl Med Assoc*, 2003, 95(3): 213–218.
  61. Sista, R. S., Eckhardt, A. E., Srinivasan, V., Pollack, M. G., Palanki, S., Pamula, V. K. Heterogeneous Immunoassays Using Magnetic beads On a Digital Microfluidic Platform. *Lab Chip*, 2008, 8(12): 2188-2196.
  62. Wu, A. H. B. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. *Clin Chim Acta*, 2006, 369(2): 119-124.
  63. Singh, H., Morioka, K., Shimojima, M., An, L. V., Nakajima, H., Hemmi, A., Uchiyama, K., Loong, S. K., AbuBakar, S., Yang, M., Sugamatak, M. A Handy Field-Portable ELISA System for Rapid Onsite Diagnosis of Infectious Diseases. *Jpn J Infect Dis*, 2016, 69: 435-438.
  64. Liu, G., Lin, Y. Nanomaterial Labels in Electrochemical Immunosensors and Immunoassays. *Talanta*, 2007, 74(3): 308-328.
  65. Wild, D. The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. 4<sup>th</sup> Edition, Elsevier Ltd., (2013).

66. Owen, J., Punt, J., Stranford, S. A., Jones, P. P. KUBY Immunology. 7<sup>th</sup> Edition, W. H. Freeman and Company, (2013).
67. Nairn, R. C. Standardization in immunofluorescence. *Clin Exp Immunol*, 1968, 3: 465-476.
68. Odell, I. D., Cook, D. Immunofluorescence Techniques. *J Invest Dermatol*, 2013, 133: 1-4.
69. Im, K., Mareninov, S., Diaz, M. F. P., Yong, W. H. An introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*, 2019, 1897: 299-311.
70. Zaidi, P., Kamal, S. Radioimmunoassay: Principle and Technique. *J Pak Med Assoc*, 1993, 43(12): 264-267.
71. Burrell, C. J., Howard, C. R., Murphy, F. A. Fenner and White's Medical Virology. 5<sup>th</sup> Edition, Elsevier Inc., (2017).
72. Kennaway, D. J. A critical review of melatonin assays: Past and present. *J Pineal Res*, 2019, 67: e12572.
73. Witherspoon, L. R. Radioimmunoassayists Must Embrace New Technology. *J Nucl Med*, 1989, 30(9): 1571-1573.
74. Boguszewska, K., Szewczuk, M., Urbaniak, S., Karwowski, B. T. Review: immunoassays in DNA damage and instability detection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2019, 76: 4689-4704.
75. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 2015, 72: 4-15.
76. Lequin, R. M. Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Clinical Chemistry*, 2005, 51(12): 2415-2418.
77. Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., Morimoto, S. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 2018, 72: 32-42.
78. Chiswick, E. L., Duffy, E., Japp, B., Remick, D. Detection and Quantification of Cytokines and Other Biomarkers. *Methods Mol Biol*, 2012, 844: 15-30.
79. Cheow, L. F., Ko, S. H., Kim, S. J., Kang, K. H., Han, J. Increasing the Sensitivity of ELISA using Multiplexed Electrokinetic Concentrator. *Anal Chem*, 2010, 82(8): 3383-3388.

80. Yolken, R. H., Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Practical Tool for Rapid Diagnosis of Viruses and Other Infectious Agents. *Yale J Biol Med*, 1980, 53: 85-92.
81. Butler, J. E. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J Immunoassay*, 2000, 21: 165–209.
82. Baker, H. N., Murphy, R., Lopez, E., Garcia, C. Conversion of a Capture ELISA to a Luminex xMAP Assay using a Multiplex Antibody Screening Method. *Journal of Visualized Experiments*, 2012, 65: 1-7.
83. Vidal, J. C., Bertolín, J. R., Bonel, L., Asturias, L., Arcos-Martínez, M. J., Castillo, J. R. Rapid determination of recent cocaine use with magnetic particles-based enzyme immunoassays in serum, saliva, and urine fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 125: 54-61.
84. Park, H., Hwang, M. P., Lee, K. H. Immunomagnetic nanoparticle-based assays for the detection of biomarkers. *International Journal of Nanomedicine*, 2013, 8: 4543-4552.
85. Jin, K., Hu, S., Su, Y., Yang, C., Li, J., Ma, H. Disposable impedance-based immunosensor array with direct-laser writing platform. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1067: 48-55.
86. Gonsalves, K. E., Halberstadt, C. R., Laurencin, C. T., Nair, L. S. Biomedical Nanostructures. John Wiley & Sons Inc., (2008).
87. Zhanga, H., Miller, B. Immunosensor-based label-free and multiplex detection of influenza viruses: state of the art. *Biosens Bioelectron*, 2019, 141: 111476-111512.
88. Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, 2016, 60: 1-8.
89. Goode, J. A., Rushworth, J. V. H., Millner, P. A. Biosensor Regeneration: A Review of Common Techniques and Outcomes. *Langmuir*, 2015, 31: 6267-6276.
90. Perumal, V., Hashim, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *J Appl Biomed*, 2014, 12: 1–15.
91. Mello, L. D., Kubota, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chem*, 2002, 77: 237–256.
92. Damborský, P., Svitel, J., Katrlík, J. Optical biosensors. *Essays in Biochemistry*, 2016, 60: 91-100.
93. Hock, B. Antibodies for immunosensors. *Anal Chim Acta*, 347: 177–186.

94. Bahadir, E. B., Sezgintürk, M. K. Applications of electrochemical immunosensors for early clinical diagnostics. *Talanta*, 2015, 132: 162–174.
95. Azek, F., Grossiord, C., Joannes, M., Limoges, B., Brossier, P. Hybridization Assay at a Disposable Electrochemical Biosensor for the Attomole Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA. *Anal Biochem*, 2000, 284: 107–113.
96. Authier, L., Grossiord, C., Brossier, P. Gold Nanoparticles-Based Quantitative Electrochemical Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA Using Disposable Microband Electrodes. *Anal Chem*, 2001, 73(18): 4450–4456.
97. Susmel, S., O’Sullivan, C. K., Guilbault, G. G. Human cytomegalovirus detection by a quartz crystal microbalance immunosensor. *Enzyme and Microb Technol*, 2000, 27: 639–645.
98. Wacogne, B., Guerrini, J.-S., Mangeat, T., Benalia, H., Pieralli, C., Rouleau, A., Boireau, W., Coaquette, A., Herbein, G., Davrinche, C., Pazart, L. The MEDICALIP Project: Toward the screening of the cytomegalovirus. *IRBM*, 2011, 32: 66–68.
99. Huang, W., Xiang, G., Jiang, D., Lui, L., Liu, C., Liu, F., Pu, X. Electrochemical Immunoassay for Cytomegalovirus Antigen Detection with Multiple Signal Amplification Using HRP and Pt-Pd Nanoparticles Functionalized Single-walled Carbon Nanohorns. *Electroanalysis*, 2016, 28: 1126–1133.
100. Kawamura, T. Interpretação de um Teste sob a Visão Epidemiológica. Eficiência de um Teste. *Arq Bras Cardiol*, 2002, 79(4): 437–441.
101. Parikh, R., Mathai, A., Parikh, S., Sekhar, G.C., Thomas, R. Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values. *Indian Journal of Ophthalmology*, 2008, 56(1): 45–50.
102. Akobeng, A. K. Understanding diagnostic tests 1: sensitivity, specificity and predictive values. *Acta Paediatrica*, 2006, 96: 338–341.
103. Hoo, Z. H., Candlish, J., Teare, D. What is an ROC curve?. *Emerg Med J*, 2017, 34: 357-359.
104. He, X., Metz, C. E., Tsui, B. M. W., Links, J. M., Frey, E. C. Three-Class ROC Analysis - A Decision Theoretic Approach Under the Ideal Observer Framework. *IEEE Transactions on Medical Imaging*, 2006, 25(5): 571-581.
105. Monteiro, L., Cabrita, J., Mégraud, F. Evaluation of Performances of Three DNA Enzyme Immunoassays for Detection of *Helicobacter pylori* PCR Products from Biopsy Specimens. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(11): 2931-2936.

106. <http://crsouza.com/2009/07/13/analise-de-poder-discriminativo-atraves-de-curvas-roc/> (consultado a 08 de fevereiro de 2021)

107. Steinitz, M. Quantitation of the Blocking Effect to Tween 20 and Bovine Serum Albumin in ELISA Microwells. *Analytical Biochemistry*, 2000, 282: 232-238.



## **Capítulo 2**

# **Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária (Farmácia São João, S.A. – Covilhã)**

**Outubro de 2015**



# 1. Introdução

A Farmácia Comunitária, anteriormente designada Farmácia de Oficina, é um local privilegiado para a prestação de Cuidados de Saúde Primários e Secundários [1]. Desde logo se entende que a sua fácil acessibilidade à população em geral e a sua vasta distribuição a nível territorial permitem a globalização e diferenciação de cuidados de saúde contribuindo de uma forma ativa para a melhoria da qualidade de vida das populações que servem. Neste contexto, surge-nos o Farmacêutico Comunitário, profissional de saúde dotado de conhecimentos técnico-científicos que lhe permitem estabelecer a ligação medicamento-utente de forma responsável e profissional, intervindo ativamente na sensibilização para o uso correto e racional dos medicamentos e outros produtos de saúde, assegurando a sua eficácia e segurança, e garantindo a máxima qualidade em todos os serviços que presta. Desta forma, é legítimo afirmar que o doente é o cerne da atividade do farmacêutico e que o medicamento e toda a sua envolvimento são o seu objeto de trabalho. No entanto, o exercício da atividade farmacêutica não é um ato isolado, mas antes uma atividade coordenada e integrada de diversos profissionais em equipas multidisciplinares que visa, em última análise, a promoção da Saúde Pública [2, 3].

Por forma a permitir que o farmacêutico comunitário desempenhe com rigor e qualidade as suas funções, a farmácia deve possuir uma estrutura adequada tanto ao nível das instalações e equipamentos como no que diz respeito aos recursos humanos, sistema informático, fontes de informação, etc [2, 4].

O meu estágio em Farmácia Comunitária foi realizado na Farmácia São João, na Covilhã, e, dada a minha situação de trabalhador-estudante, teve contornos diferenciados em relação ao que habitualmente acontece neste estágio, nomeadamente, o período mais alargado em que decorreu (ligeiramente superior a 1 ano) e o número de horas diárias passadas na farmácia (Anexo 2). Se por um lado essa diferença me permitiu ter uma noção do que vai mudando na farmácia em termos de sazonalidade, por exemplo, por outro, dificultou de alguma forma o meu enquadramento no dia-a-dia da farmácia em termos da sua rotina diária e de algumas atividades que só se realizam “de tempos a tempos” ou em determinados períodos do dia. Ainda assim, foi uma experiência enriquecedora, de intercâmbio de conhecimentos, de interação com os utentes, numa perspetiva diferente da que estou habituada no âmbito da minha atividade profissional como Técnica Superior de Análises Clínicas, e de integração

numa equipa de trabalho dinâmica, profissional e de elevada responsabilidade e capacidade técnico-científica.

Os conhecimentos e competências adquiridos durante esse período encontram-se descritos neste relatório, que seguiu, de uma forma geral, os pontos descritivos apresentados na Caderneta do Aluno do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF).

## **2. Caracterização da Farmácia**

### **2.1. Organização**

A função das Farmácias, enquanto prestadores de serviços de saúde, vai muito para além da simples dispensa de medicamentos, disponibilizando, atualmente, uma considerável variedade de serviços e produtos. O seu bom desempenho e qualidade estão fortemente associados à sua organização interna, pilar no qual assenta o crescente melhoramento dos serviços prestados, por forma a dar resposta às exigências dos utentes, ao mesmo tempo que lhes permite voltar atenções para questões relacionadas com a saúde pública e mesmo para a intervenção na resolução de problemas sociais [5].

Esta evolução do conceito de farmácia comunitária exige o cumprimento de determinados requisitos quer ao nível das instalações e equipamentos, como do sistema informático e fontes de informação ou ainda da formação, responsabilidades e competências dos seus profissionais, aquisição, entrada e armazenamento de mercadorias, dispensa de medicamentos sob prescrição médica e em automedicação, entre outros, requisitos estes impostos pela rigorosa legislação que regula o sector [2, 6, 7].

A Farmácia São João funciona com o Alvará N<sup>o</sup>1085 em conformidade com o disposto no Decreto-Lei n.º307/2007, de 31 de agosto que estabelece o regime jurídico das farmácias de oficina, tendo sido autorizada a sua instalação a 27 de Maio de 1964. A sua última grande remodelação ocorreu em Janeiro de 2010 passando a fazer parte de um grupo que possui outra farmácia – a Farmácia Viriato, em Viseu – e contando com uma nova equipa técnica, novos objetivos e planos de trabalho, novo dinamismo e oferta de serviços e nova organização do espaço, com a premissa de que todos os dias se pode melhorar na procura da excelência e da qualidade do serviço que visa, acima de tudo, a satisfação e o bem-estar dos utentes. Desde 2011 tem disponível, para todos os utentes interessados, o serviço de Gestão e Acompanhamento Farmacoterapêutico e em 2012 implementou um sistema de entregas ao domicílio para o qual dispõem de um carro identificado com o nome e logotipo da farmácia.

A Farmácia São João integra a rede das Farmácias Portuguesas da Associação Nacional das Farmácias (ANF), de que é associada. Não obstante a sua adesão ao programa das

Farmácias Portuguesas, a Farmácia São João desenvolveu também, em projeto próprio, um cartão de cliente destinado a todos os utentes interessados.

## **2.2. Localização**

A Farmácia São João está situada na Rua Marquês D'Ávila e Bolama nº342, 6200-053 Covilhã, distrito de Castelo Branco, pertencendo à União de Freguesias da Covilhã e Canhoso (que agregou, entre outras, a antiga Freguesia da Conceição à qual pertencia a Farmácia).

A sua localização, num dos bairros da zona antiga da cidade da Covilhã, contribui para o facto de ser frequentada, maioritariamente, por uma população idosa, frequentemente polimedicados e que exige atenção e cuidados redobrados por parte da equipa de profissionais da farmácia.

Por outro lado, e por se encontrar relativamente próxima do Polo Central da Universidade da Beira Interior (onde funcionam a Faculdade de Ciências, a Faculdade de Letras e a Faculdade de Engenharia), é também frequentada por uma percentagem considerável de jovens adultos, com perfis bastante distintos da população idosa e que, por isso, contribuem para a diversidade de solicitações com que os profissionais são confrontados todos os dias e que lhes permitem por em prática, aprofundar e consolidar o saber e conhecimentos adquiridos em cada um dos seus percursos académicos.

## **2.3. Horário de Funcionamento**

A Farmácia São João funciona todos os dias úteis das 09:00H às 20:00H, sem pausa para almoço. Aos sábados está aberta das 09:00H às 13:00H. Nos dias em que a farmácia está de serviço funciona durante 24 horas estando de porta aberta ao público no período das 09:00H às 23:00H. A partir dessa hora e até às 09:00H do dia seguinte (atendimento noturno) o serviço é realizado através de um postigo localizado junto à porta de entrada, mediante o toque da campainha que se encontra no exterior da farmácia. O sistema que estabelece a farmácia de serviço define uma ordem para as farmácias, é rotativo e depende do número de farmácias existentes na cidade da Covilhã. Assim, cada farmácia está de serviço com uma periodicidade de 8 dias (são 8 as farmácias existentes na cidade da Covilhã). O mapa mensal das farmácias de serviço,

com a respetiva localização e contacto, encontra-se afixado em local bem visível na porta de entrada da farmácia.

## **2.4. Recursos Humanos**

Nos últimos anos foi notória a evolução e o crescente padrão de qualidade imposto pelos profissionais da Farmácia São João na prestação dos diversos serviços de que dispõe. O seu sentido de responsabilidade, entrega e competência são uma mais-valia no atendimento aos utentes. São eles o rosto da farmácia e o espelho da sua organização e funcionamento.

A farmácia São João conta com um Administrador único – o proprietário – e um quadro técnico constituído pelo Diretor Técnico, que lidera a equipa, pelo Farmacêutico Adjunto, por mais um Farmacêutico e por um Técnico de Farmácia. A equipa fica completa com um funcionário indiferenciado ao qual compete a limpeza geral da farmácia. Todos se encontram devidamente identificados pelo uso de um cartão onde consta o nome e a categoria profissional, obrigatório segundo a legislação em vigor [6, 7].

Com exceção do seu administrador, que não está presente todos os dias, a restante equipa encontra-se diariamente na farmácia, de acordo com o seu horário de funcionamento e dias de serviço, respeitando as pausas, folgas e demais regalias de que possam usufruir. Para além do pessoal do quadro, a Farmácia São João conta ainda com a colaboração de profissionais responsáveis por consultas e serviços de especialidade (consultas de nutrição e podologia e serviço de massagens), com presença regular, mas não diária na farmácia.

## **2.5. Espaço Físico**

### **2.5.1. Espaço Exterior**

De acordo com a legislação em vigor, exteriormente, qualquer farmácia deve apresentar características específicas que a tornem perfeitamente visível e identificável [2, 6, 7].

O número 342 da Rua Marquês D'Ávila e Bolama apresenta, na sua fachada, uma placa com a designação “Farmácia São João” e o respetivo logotipo, e ainda um dispositivo

luminoso com o símbolo “cruz verde” que se encontra ligado sempre que a farmácia está aberta.

O espaço físico exterior é composto por duas montras envidraçadas viradas para a rua e separadas entre si pela porta de acesso ao interior da farmácia. Esse acesso compreende uma porta externa, seguida de uma antecâmara onde está localizado o postigo para o atendimento noturno e, finalmente, uma porta interna já localizada no interior da farmácia. Todas estas estruturas são em vidro, o que permite a afixação de informação importante e/ou obrigatória, como a designação da Direção Técnica da Farmácia, o seu horário de funcionamento, o quadro de distribuição das farmácias de serviço, informações sobre serviços ou campanhas disponíveis na farmácia, informação publicitária referente ao cartão das Farmácias Portuguesas e ao cartão cliente da Farmácia São João, etc. Aplicado na fachada da farmácia está um dispositivo automático de venda de preservativos em funcionamento 24 horas por dia. As duas montras são utilizadas para exposição de produtos de interesse e, muitas vezes, em função da sazonalidade ou dos compromissos sociais do calendário civil.

Durante a realização do meu estágio, e dada a sua durabilidade, tive a possibilidade de participar na elaboração das montras em diferentes períodos do ano e verificar o tipo de artigo que preferencialmente se expõem em cada uma dessas épocas. Por exemplo, com a chegada da primavera cresce o interesse nos protetores solares ou nos produtos dietéticos e de cuidados com o corpo, enquanto que ocasiões como o Natal, o dia da mãe ou o dia dos namorados nos direcionam mais para artigos de higiene e cuidado com o corpo, cuidados de criança ou até mesmo artigos mais específicos como seja, por exemplo, o calçado ortopédico.

### **2.5.2. Espaço Interior**

A distribuição do espaço interior das farmácias comunitárias, e em particular no que se refere à Farmácia São João, segue o disposto na lei, quer em termos das diferentes zonas que tem que possuir – zona de atendimento ao público, armazém, gabinete de atendimento personalizado, instalações sanitárias, etc. – quer em termos da dimensão mínima permitida para cada um desses espaços, ou mesmo o tipo de materiais utilizados no mobiliário acessório ou a informação obrigatória que tem que estar perfeitamente visível a todos quantos procurem a farmácia [4, 6, 7]. Não obstante as especificações técnicas, há que ter sempre em mente a premissa fundamental do atendimento farmacêutico – assegurar a saúde, o bem-estar e a satisfação do utente

garantindo um atendimento com a máxima qualidade e profissionalismo. Desta forma, é essencial que a farmácia possua um ambiente calmo e agradável, que os seus colaboradores sejam profissionais e transmitam confiança, que aos utentes seja garantida a máxima descrição e confidencialidade no atendimento e que se consiga uma comunicação eficaz entre farmacêutico e utente contribuindo para a obtenção de ótimos resultados no que diz respeito à prestação de cuidados de saúde [1, 2].

A Farmácia São João possui, no piso (0) (ao nível da rua), uma zona destinada ao atendimento ao público em geral, dois gabinetes para atendimento personalizado, uma zona destinada à receção, processamento e armazenamento de encomendas e dois sanitários. Num piso inferior (-1) está localizada uma zona de armazém, o escritório para apoio logístico, o laboratório, onde também se encontra a bibliografia obrigatória e outra de interesse para consulta sempre que necessário, e uma zona de copa equipada com máquina de café, micro-ondas, cafeteira elétrica e cacifos individuais, para uso do pessoal.

### **2.5.2.1. Zona de Atendimento ao Público**

A zona destinada ao atendimento ao público é constituída por quatro postos de atendimento diferenciados, todos informatizados (programa informático *Sifarma2000*) e equipados com leitores óticos de códigos de barra e impressoras de verso de receitas individuais. A caixa é comum a todos os postos uma vez que a farmácia possui um sistema automático de gestão de caixa - *CashGuard*<sup>®</sup>. Trata-se de um sistema de aceitação e cobrança de numerário que permite automatizar todos os processos relativos à gestão de caixa, garantir a devolução do troco exato e otimizar o processo de cobrança, diminuindo os erros associados às transações e reforçando a segurança, para além de possibilitar aos colaboradores o atendimento em qualquer um dos postos. Existe ainda um terminal de pagamento automático (multibanco).

Esta zona, sendo o principal espaço de permanência do utente, está dotada de uma zona de espera que lhes permite sentar enquanto aguardam o atendimento, um equipamento automático para medição do peso, altura e pressão arterial, expositores lineares e verticais de artigos diversificados (dermofarmácia e higiene corporal, higiene oral, preservativos, calçado ortopédico, puericultura, alimentação infantil e suplementos alimentares, etc.) e alguma informação útil e/ou obrigatória (por exemplo, a designação do Diretor Técnico e a informação de existência de livro de reclamações). Por trás dos postos de atendimento encontram-se expostos os Medicamentos Não

Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) e alguns módulos de gavetas onde é armazenado o “stock” de MNSRM e alguns outros artigos como, por exemplo, material de pensos, emplastos, etc.

Numa das montras da zona de atendimento, em local bem visível, encontra-se afixada a tabela de preços dos serviços farmacêuticos disponíveis na farmácia.

Durante o período em que decorreu o meu estágio percebi a importância que é dada a esta zona da farmácia, quer em termos de limpeza e arrumação, como em termos de seleção e disposição dos artigos expostos. Toda a equipa da Farmácia São João tem bem presente que esta zona é o “rosto da farmácia”, responsável pela primeira impressão causada no utente. Assim, os artigos nos expositores lineares que, regra geral, se encontram organizados por área e/ou marca, são periodicamente reorganizados por forma a evidenciar alguns, em detrimento de outros, consoante a sua importância sazonal ou festiva ao longo do ano. Também os MNSRM seguem esta rotatividade ao longo do ano (por exemplo, na altura da primavera é dada mais notoriedade a anti-histamínicos, enquanto que no inverno se evidenciam mais antigripais e anti-inflamatórios). Uma vez que o meu estágio se prolongou por mais tempo do que o habitual, foi-me possível participar por mais do que uma vez nestas mudanças, quer em termos de MNSRM, quer em termos dos outros artigos expostos tanto nas montras como nos expositores lineares e verticais que se encontram na zona de atendimento geral da farmácia. Foi-me também possível perceber que o tipo de aconselhamento e esclarecimento mais frequente que é necessário prestar ao utente também acompanha, obviamente, esta mudança periódica em função, por exemplo, da altura do ano.

### **2.5.2.2. Zona de Receção de Encomendas e de Armazenamento**

A zona destinada à receção, processamento e armazenamento de encomendas fica localizada nas traseiras da zona de atendimento. O posto de receção de encomendas, devidamente informatizado, está equipado com computador, leitor ótico de código de barras, impressora de códigos de barra e telefone, permitindo a gestão de todo o processo de aprovisionamento da farmácia. É aqui que as encomendas são geradas e enviadas aos fornecedores, e é também aqui que são rececionadas e conferidas. Neste posto são também regularizadas quaisquer situações de devoluções e emissão de notas de crédito. Nesta zona está também localizado o contentor da VALORMED para reciclagem de medicamentos fora de uso.

Após a conferência e validação das encomendas os artigos são arrumados nos respetivos locais de armazenamento. O armazenamento da grande maioria dos medicamentos, incluindo todos os Medicamentos Sujeitos a Receita Médica (MSRM), é feito em dois armários metálicos de gavetas deslizantes e três estantes que ocupam a zona envolvente ao posto de receção de encomendas. A distribuição nos armários e estantes é a seguinte:

- Armário principal (de maior dimensão)

Gavetas superiores: pós e granulados

Gavetas inferiores: xaropes, produtos de utilização externa, medicamentos de uso veterinário e ampolas

Gavetas intermédias: comprimidos e cápsulas (organizados por ordem alfabética)

Neste armário há ainda uma pequena zona de uma das gavetas centrais para medicamentos, ou outros produtos, que tenham ficado em falta em determinado atendimento. Estes artigos, a partir do momento em que ficam disponíveis e prontos a entregar ao utente, são embalados e identificados com o nome do produto, a quantidade contida no interior da embalagem, o nome do utente, a data da falha na entrega ou da encomenda e a situação em termos de regularização burocrática e de pagamento (pago/não pago/aguarda entrega de receita).

- Armário secundário (de menor dimensão)

Injetáveis, inaladores, produtos de administração rectal ou vaginal, colírios e pomadas oftálmicas e contraceptivos orais (pilulas)

- Estantes

Pomadas e cremes

Soros e desinfetantes

Champôs e loções, entre outros

Uma outra zona de armazém fica localizada no piso inferior da farmácia e destina-se a artigos de maiores dimensões (como calçado ortopédico, por exemplo) e a MSRM cujas dimensões, ou o facto de existir um maior “stock” em determinado momento, não permite que se arrumem todas as unidades no respetivo armário. É também neste piso, mais concretamente no laboratório, que está o frigorífico (com devido controlo de temperatura), para os produtos que necessitam de armazenamento no frio, e um

armário, devidamente trancado e individualizado, para a medicação psicotrópica e estupefacientes (MPE), disposta por ordem alfabética.

No meu primeiro dia de estágio foi-me explicada a forma com a farmácia estava organizada, o que existia em cada um dos pisos, a forma como os medicamentos, e outros produtos, se encontravam distribuídos pelas diferentes zonas de armazenamento e a sua disposição dentro dos armários e gavetas. Parte do dia foi passado a abrir e fechar gavetas e ver os medicamentos que lá se encontravam para me começar a familiarizar com a sua localização e com os seus nomes comerciais. Foi também nesse dia que me explicaram o funcionamento do processo de gestão de encomendas e o registo e arrumação dos produtos recebidos. Depois desse dia, e durante a primeira semana que passei na farmácia, fiz todo o processo de rececionamento, processamento e armazenamento das encomendas, inicialmente de forma acompanhada e por fim sem acompanhamento.

### **2.5.2.3. Gabinetes de Atendimento Personalizado**

Os dois gabinetes para atendimento personalizado e confidencial estão localizados no piso 0 e é lá que os utentes são atendidos para:

- Medição de parâmetros bioquímicos (glicémia capilar, colesterol total, triglicéridos e ácido úrico). Quando algum utente manifesta interesse em avaliar um dos três primeiros parâmetros atrás referidos, o farmacêutico/técnico de farmácia aconselha-o vivamente a respeitar um jejum de cerca de 10 horas, sob pena do resultado sofrer alteração significativa (os valores de referência são para a condição de jejum).

- Medição da pressão arterial (pode ser feita no equipamento eletrónico que se encontra na sala de espera da zona de atendimento ou, de forma mais personalizada, no gabinete de atendimento por um farmacêutico). Os valores da pressão arterial, bem como dos parâmetros bioquímicos, podem ser registados em cartões personalizados da Farmácia São João, permitindo analisar a sua variação ao longo do tempo, no caso de o utente fazer medições com alguma regularidade. Esse registo é também feito no *Sifarma2000*, na ficha do utente.

- Realização de testes de gravidez

- Administração de injetáveis e vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação (por exemplo, a vacina da gripe)

- Consultas de podologia e de nutrição

- Campanhas promocionais e de demonstração de produtos de higiene e cuidado pessoal e dermofarmácia (por exemplo, da linha Skinceuticals). Para estas campanhas é marcado um dia de demonstração com a conselheira da marca e a farmácia convida alguns utentes, que possam estar interessados, a participar. Os horários são estabelecidos de acordo com a disponibilidade dos utentes e o atendimento é individual e personalizado.

- Massagens

- Aconselhamentos diversos de acordo com as solicitações dos utentes ou com a identificação de situações que necessitem de alguma atenção especial por parte do farmacêutico.

Cada um destes gabinetes está equipado com todo o material necessário à execução das funções a que se destina (inclusive contentores para desperdício de material contaminado e corto-perfurante – grupo III e IV, respetivamente) e são sempre mantidos devidamente limpos e arrumados e o material é verificados e repostos regularmente. Um destes gabinetes está também disponível como local de repouso dos colaboradores nos dias em que a farmácia está de serviço noturno.

#### **2.5.2.4. Laboratório**

O laboratório da Farmácia São João possui bancada, armários, lavatório e exaustor e está equipado com uma balança analítica e algum material de laboratório, respeitando os requisitos legais. Um dos armários comporta a biblioteca e contém todas as publicações exigidas por lei e outras, de importância assinalável, que podem ser consultadas por todos os colaboradores sempre que necessário. É neste espaço que são reconstituídas as preparações extemporâneas (xaropes).

A importância do laboratório decaiu ao longo do tempo com a, cada vez menor, necessidade de preparação de manipulados. Na Farmácia São João não se preparam manipulados. Sempre que há alguma solicitação nesse sentido, o pedido é encaminhado para a Farmácia Viriato em Viseu (do mesmo proprietário), que prepara o manipulado e o envia, já pronto, para a Farmácia São João.

Uma pequena área do laboratório está reservada para o servidor do sistema informático.

#### **2.5.2.5. Escritório**

No escritório são desenvolvidas todas as atividades relativas à gestão e administração da farmácia, bem como ao processo contabilístico e de faturação, tarefas que assumem um papel cada vez mais importante, dada a conjuntura atual em que vivemos (todos os processos têm que ser muito bem controlados para se evitarem perdas e custos desnecessários, quer em termos de controlo de stocks, quer de faturação ou até mesmo na gerência de situações inespecíficas mas essenciais ao bom funcionamento da farmácia como, por exemplo, a limpeza e manutenção do espaço).

Os monitores do sistema de videovigilância estão aqui localizados e, contígua ao escritório, está também uma zona de conferência de receituário, tarefa da responsabilidade da Direção Técnica.

#### **2.5.2.6. Instalações Sanitárias**

A Farmácia São João possui dois sanitários, um que se destina a ser utilizado pelos seus colaboradores, situado numa zona contígua à zona de receção de encomendas e armazenamento do piso (0), e outro que destina aos utentes, situado num dos gabinetes de atendimento personalizado.

#### **2.5.2.7. Outras Áreas**

Nas instalações da Farmácia São João é possível encontrar ainda uma zona de copa, num espaço que permite sentar e disfrutar de um café ou de uma pequena refeição, equipada com máquina de café, micro-ondas e cafeteira elétrica. É também nesta zona que se encontram instalados cacifos individuais, para uso pessoal dos colaboradores.

Integrado num dos gabinetes de atendimento personalizado fica o local de repouso e recolhimento, utilizado durante o serviço noturno das escalas de serviço.

## 2.6. Equipamentos de Apoio e Recursos Informáticos

Designam-se de equipamentos ou estruturas de apoio todos os acessórios que, sendo ou não fundamentais para o desempenho da atividade farmacêutica, são essenciais ao bom funcionamento da farmácia, sendo, alguns deles, de inclusão obrigatória.

Neste campo, a Farmácia São João está equipada com aparelhos de ar condicionado e de monitorização da temperatura e humidade (termohigrómetros) nas suas diferentes áreas estruturais (“software” *Microlab*®), frigorífico, sistemas de videovigilância na área de atendimento e nas áreas internas da farmácia, sistemas de alarme de intrusão e de alarme de incêndio, sinaléticas de saída visíveis, extintores e outras estruturas indiferenciadas, como sejam, balcões, cadeiras, marquesa, dispensador de água, central telefónica e diverso material informático necessário à realização de todas as atividades da farmácia. Possui ainda nas suas instalações algum equipamento mais específico para a atividade farmacêutica, como seja, balança analítica, material de vidro e outro material de laboratório e ainda suporte bibliográfico. Todos os equipamentos são alvo de procedimentos de manutenção e calibração periódica, salvo aqueles em que estes procedimentos não sejam aplicáveis.

Em termos de recursos informáticos, nomeadamente de *software*, todos os computadores da Farmácia São João possuem o programa *Sifarma2000*. É com este suporte informático que é gerido todo o processo de gestão, aprovisionamento e técnico-científico da farmácia, permitindo fazê-lo de forma mais célere, melhorando o atendimento e minimizando os erros associados. Todos os postos informatizados possuem também ligação à internet tornando viável pesquisas rápidas de informação científica em bases de dados fidedignas (por exemplo, do INFARMED).

O *Sifarma2000* garante a articulação entre as diferentes áreas funcionais da farmácia, sendo que a sua vasta gama de funcionalidades vai desde o atendimento à gestão de *stocks* permitindo gerir todo o circuito dos produtos existentes na farmácia e também fazer registos de dados dos utentes (sempre que estes o autorizem) facilitando o seu acompanhamento farmacoterapêutico. Está munido de diversa informação técnico-científica e de apoio ao processamento de receituário e faturação e é alvo de atualizações frequentes e imprescindíveis, dada a constante evolução e permanentes mudanças a que o sistema farmacêutico está sujeito. A ligação à internet é uma ferramenta que funciona como adjuvante deste sistema uma vez que possibilita, em tempo real, receber atualizações de preços e informações de alerta. De forma a garantir recuperação de dados no caso de eventuais perdas de informação por avaria

informática, é realizada diariamente uma cópia de segurança de dados no servidor do sistema informático.

De seguida saliento algumas das funcionalidades do Sifarma2000 que me foram transmitidas e que tive oportunidade de experimentar ou de ver em funcionamento por algum colaboradores da farmácia, durante o período do meu estágio:

- Seleção de produtos e fornecedores;
- Elaboração, envio e receção de pedidos de encomendas (diariamente num formato semi-automático dos produtos esgotados e também encomenda “manual”);
- Gestão de *stocks* e prazos de validade;
- Impressão de códigos de barras;
- Devoluções e quebras de produtos;
- Dispensa, com imediata atualização de *stock*, de medicamentos e outros produtos: com ou sem receita médica (de acordo com a respetiva entidade de convenção e percentagem de participação), com protocolo, em sistema de venda suspensa, registo e cobrança de serviços farmacêuticos, devoluções e crédito;
- Consulta de vendas e respetiva edição/anulação;
- Pesquisa por nome comercial, grupo genérico ou grupo homogéneo;
- Consulta de informação sobre medicamentos e outros produtos (produtos relacionados – classificação ATC, dosagens, indicações, contraindicações, efeitos adversos, interações, posologia, prazo de validade, forma farmacêutica, informação específica para o utente e/ou farmacêutico);
- Gestão de utentes com a possibilidade do seu registo integrando um acompanhamento fisiopatológico e farmacoterapêutico;
- Faturação a entidades, fecho da faturação e gestão de lotes faturados;
- Encerramento do dia.

### **3. Informação e Documentação Científica**

A Deliberação n.º414/CD/2007 de 07 de Dezembro de 2007 do INFARMED determina quais os documentos de que a farmácia deve obrigatoriamente dispor [6, 7, 8]. São eles a Farmacopeia Portuguesa e o Prontuário Terapêutico (PT). Não obstante a existência da bibliografia obrigatória, as farmácias devem possuir outras publicações, como sejam, o Formulário Galénico Português, o Regimento Geral dos Preços dos Medicamentos e Manipulações, o Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos e ainda os Estatutos da Ordem dos Farmacêuticos sem esquecer, claro, o Manual de Boas Práticas para a Farmácia Comunitária. Para além destas publicações, a Farmácia São João possui ainda outras, quer em suporte de papel quer em suporte digital: Simposium Terapêutico, Dicionário de Termos Médicos, algumas publicações periódicas como as revistas Farmácia Distribuição e Mundo Farmacêutico, e algumas publicações e apontamentos recolhidas, por exemplo, de palestras e workshops, e que, por serem considerados importantes para o exercício da atividade, são arquivadas na farmácia por tema (novos fármacos, novos esquemas terapêuticos, patologias específicas ou acordos e legislação farmacêutica).

É preciso não esquecer que o exercício da atividade farmacêutica, como todas na área da saúde, exige uma constante atualização por parte dos seus profissionais pelo que é de importância vital que estes disponham de fontes de informação atuais e fidedignas e participem em formações periódicas que lhes permitam consolidar e enriquecer conhecimentos previamente adquiridos e mesmo apreender novas informações que vão surgindo com a constante evolução científica a que esta área do saber está sujeita.

Durante o meu estágio foi-me possível ver e aplicar a constante necessidade de consulta de informação nos mais diversos atendimentos, de modo a responder a todas as solicitações dos utentes. Numa sociedade cada vez mais virada para as novas tecnologias somos, neste caso os utentes, “bombardeados” com detalhes de informação, muitas vezes incorretos, e que os levam a colocar as mais variadas questões. Cabe-nos a nós, farmacêuticos, tentar esclarecê-los de forma correta e preencher essas pequenas lacunas, contribuindo para uma melhor utilização dos medicamentos e produtos de saúde e, em última análise, para o seu bem-estar. Na Farmácia São João essa premissa é uma constante e é também por esse motivo que os profissionais da farmácia tentam reunir diversas fontes de informação que entendam os possam auxiliar nesse processo.

Muitas vezes essas consultas são feitas *on-line* no momento do atendimento, em sítios fiáveis e credenciados (por exemplo, no INFOMED, no sítio do INFARMED).

De acordo com as Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária [2]:

*“No processo de cedência de medicamentos o farmacêutico deve obrigatoriamente dispor de acesso físico ou eletrónico que contenham informação sobre indicações, sobre contraindicações, interações, posologia e precauções com a utilização com medicamento. Fontes consideradas de acesso obrigatório no momento da cedência de medicamentos:*

*- Prontuário Terapêutico;*

*- Resumo das Características dos Medicamentos (RCM);*

*Fontes complementares recomendadas para consulta em farmacoterapia:*

*- Martindale, The Extra Pharmacopeia;*

*- British National Formulary;*

*- Epocrates online”*

Em Portugal existem algumas fontes de informação, chamadas externas, às quais a farmácia pode e deve recorrer no exercício da sua atividade profissional, tal como os Centros de Informação sobre Medicamentos (CIM) [9-14]. Estes CIM's são unidades funcionais de determinada entidade que visam proporcionar informação objetiva, independente e em tempo útil, sobre medicamentos e outros produtos farmacêuticos, aos profissionais de saúde. Estes são alguns dos CIM existentes em Portugal:

- Centro de Informação de Medicamentos da Ordem dos Farmacêuticos

Serviço destinado a disponibilizar aos farmacêuticos informação independente, avaliada e atualizada sobre medicamentos e resolver problemas específicos relacionados com o seu uso, contribuindo também para a atualização e formação contínua do Farmacêutico.

- Centro de Documentação e Informação de Medicamentos da Associação Nacional das Farmácias (CEDIME)

Suporte técnico e científico prestado pela Associação Nacional de Farmácias (ANF) à atividade das farmácias nas áreas do medicamento e da saúde.

- Serviço de Informação sobre Medicamentos e Gravidez do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (SIMeG)

Pretende dar resposta, em tempo útil, a questões relacionadas com a exposição a fármacos, produtos tóxicos e meios complementares de diagnóstico durante a gravidez, bem como promover o uso racional de medicamentos e meios complementares de diagnóstico durante esse período.

- Centro de Informação do Medicamento e dos Produtos de Saúde do INFARMED (CIMI)

Responde a pedidos de informação e esclarecimento de dúvidas relacionadas com licenciamento de entidades, medicamentos e produtos de saúde (dispositivos médicos e produtos cosméticos) a todos os profissionais de saúde.

- Centro de Documentação Técnica e Científica do INFARMED (CDTC)

Tem como objetivo organizar, gerir e difundir recursos e fontes documentais especializadas na área do medicamento e produtos de saúde, de modo a contribuir para a satisfação das necessidades de informação, educação e investigação dos profissionais de saúde, estudantes, investigadores e cidadãos em geral.



## 4. Medicamentos e outros Produtos de Saúde

Na Farmácia São João, como em todas as farmácias, existe um vasto leque de medicamentos e outros produtos de saúde que podem estar distribuídos da forma que a farmácia entender, no âmbito do seu sistema funcional e organizacional, desde que obedecendo ao definido na lei em termos de conservação e armazenamento, e seguindo uma lógica dinâmica, facilmente compreendida por todos os colaboradores da farmácia e que facilite o exercício da sua atividade. Neste caso, a localização dos diferentes artigos segue o exposto no ponto 2.5.2 do presente relatório sendo que, no sistema informático, cada produto tem a indicação, na sua “ficha de produto”, de qual a gama (armário) e prateleira (ou gaveta) onde se encontra. Esta classificação, introduzida há pouco tempo na farmácia, veio ajudar muito a localização imediata de um determinado medicamento ou outro produto pelos vários colaboradores.

### 4.1. Definição de Conceitos e Regime Jurídico

Durante o desenrolar do meu estágio, e sempre que surgia uma oportunidade, toda a equipa de colaboradores da Farmácia São João, me foi chamando a atenção para o uso correto de alguns termos de uso comum no meio farmacêutico e suas corretas definições, aliás, à semelhança do que também foi acontecendo nas diversas Unidades Curriculares (UC's) do MICF, incentivando-me à pesquisa em fontes Nacionais credenciadas. Do mesmo modo, me despertaram para a importância de conhecer o regime jurídico subjacente aos medicamentos e aos demais produtos de saúde. Destaco agora alguma dessa informação.

O Decreto-Lei nº176/2006, que estabelece o Estatuto do Medicamento, define Medicamento como [15]:

*“toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas”*

sendo que, qualquer outra substância que se diferencie desta definição, é designada como “produto” e classificada de acordo com a sua origem e/ou finalidade (por exemplo, produtos homeopáticos, produtos para alimentação especial e dietéticos,

produtos de uso veterinário, produtos cosméticos e dermofarmacêuticos, produtos fitoterapêuticos, produtos de uso veterinário, etc.). Neste âmbito surge o conceito de Medicamento Genérico como sendo [15]:

*“medicamento com a mesma composição qualitativa e quantitativa em substâncias ativas, a mesma forma farmacêutica e cuja bioequivalência com o medicamento de referência haja sido demonstrada por estudos de biodisponibilidade apropriados”.*

e Medicamento de Referência [15]:

*“medicamento que foi autorizado com base em documentação completa, incluindo resultados de ensaios farmacêuticos, pré-clínicos e clínicos”*

Com uma importância crescente atualmente, surgem os medicamentos homeopáticos. O Estatuto do Medicamento [15] define Medicamento Homeopático como:

*“medicamento obtido a partir de substâncias denominadas stocks ou matérias-primas homeopáticas, de acordo com um processo de fabrico descrito na farmacopeia europeia ou, na sua falta, em farmacopeia utilizada de modo oficial num Estado membro, e que pode conter vários princípios”*

Para um beneficiário alvo bastante diferente, mas não menos importante, o Decreto-Lei nº314/2009 de 28 de Outubro, define Medicamento Veterinário como sendo [16]:

*“toda a substância, ou associação de substâncias, apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em animais ou dos seus sintomas, ou que possa ser utilizada ou administrada no animal com vista a estabelecer um diagnóstico médico-veterinário ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas”*

cuja responsabilidade é integralmente da competência da Direção Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV), de acordo com o estabelecido no Decreto Regulamentar nº11/2007 de 27 de Fevereiro [17].

Substâncias Psicotrópicas e Estupefacientes são substâncias que atuam ao nível do Sistema Nervoso Central (SNC) podendo causar tolerância e dependência quer física quer psíquica. As suas ações, que podem ser estimulantes ou depressoras, encontram aplicação no tratamento de um grande número de doenças, desde que usadas de forma correta, pelo que são de extrema importância em medicina. No entanto, o seu uso está muitas vezes associado a comportamentos de riscos e tráfico ilícito pelo que estão sujeitas a um controlo específico e rigoroso por forma a evitar o seu uso indevido [18]. O Decreto-Lei nº15/93 de 22 de Janeiro estabelece o Regime Jurídico do Tráfico e Consumo de Estupefacientes e Psicotrópicos apresentando as substâncias incluídas

nestas categorias divididas em tabelas classificativas [19]. Ao longo do tempo, algumas outras substâncias têm vindo a ser acrescentadas às tabelas originais (Decreto-Lei nº14/2005, de 26 de Janeiro; Decreto-Lei nº13/2012, de 26 de Março). Alguns exemplos de substâncias psicotrópicas são: metilfenidato, buprenorfina, tapentadol, benzodiazepinas.

O Estatuto do Medicamento define Preparado Oficial como [15]:

*“qualquer medicamento preparado segundo as indicações compendiais de uma farmacopeia ou de um formulário oficial, numa farmácia de oficina ou em serviços farmacêuticos hospitalares, destinado a ser dispensado diretamente aos doentes assistidos por essa farmácia ou serviço”*

enquanto que Fórmula Magistral é [15]:

*“qualquer medicamento preparado numa farmácia de oficina ou serviço farmacêutico hospitalar, segundo uma receita médica e destinado a um doente determinado”*

O Decreto-Lei nº145/2009 de 17 de Junho que estabelece as regras a que devem obedecer a investigação, o fabrico, a comercialização, a entrada em serviço, a vigilância e a publicidade dos dispositivos médicos e respetivos acessórios e transpõe, define Dispositivo Médico como [20]:

*“qualquer instrumento, aparelho, equipamento, software, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, incluindo o software destinado pelo seu fabricante a ser utilizado especificamente para fins de diagnóstico ou terapêuticos e que seja necessário para o bom funcionamento do dispositivo médico, cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de*

*i) Diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença;*

*ii) Diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência;*

*iii) Estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico;*

*iv) Controlo da conceção”*

## **4.2. Sistemas de Classificação dos Medicamentos**

A dinâmica de organização dos medicamentos numa farmácia comunitária, bem como a pesquisa de informação técnico-científica sobre determinada substância medicamentosa, assenta fortemente na classificação que lhe está atribuída. Qualquer

sistema de classificação, em qualquer área, pretende uma sistematização agrupada em função de determinadas características dos respetivos produtos. Em termos de medicamentos, são utilizadas essencialmente três classificações distintas, uma que organiza os fármacos de acordo com as suas finalidades terapêuticas – a Classificação Farmacoterapêutica -, outra que os organiza pela sua forma farmacêutica (comprimidos, cápsulas, granulados, pós orais, etc.) – a Classificação por Forma Farmacêutica – e que serve de base à organização de conteúdos da Farmacopeia Portuguesa, e outra que os classifica em termos de dispensa ao público como MSRM e MNSRM e que se encontra definida no Artigo 113º do Decreto-Lei nº176/2006 de 30 de Agosto que estabelece o Estatuto do Medicamento [15, 21, 22]. Em farmácia comunitária, e particularmente na farmácia onde estagiei, é comum usar esta divisão em MSRM e MNSRM na forma como os medicamentos estão dispostos e armazenados.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) adota a Classificação ATC (“Anatomical Therapeutic Chemical Classification”) que divide as substâncias ativas em diferentes grupos, de acordo com o órgão ou sistema sobre o qual atuam e segundo as suas propriedades terapêuticas, farmacológicas e químicas [23]. Em Portugal, a primeira aproximação à classificação ATC da OMS, foi aprovada pelo Despacho nº6914/98 de 24 de Março que determinou a aprovação e adoção oficial da Classificação Farmacoterapêutica, tendo sido revogado pelo Despacho nº21844/2004 de 12 de Outubro que a normalizou e uniformizou estabelecendo a sua correspondência com a classificação ATC. A Classificação Farmacoterapêutica é a adotada em instrumentos oficiais de apoio à prescrição, como é o caso do Prontuário Terapêutico e do Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos, bem como nos processos de autorização de introdução no mercado (AIM) e nos instrumentos que definem a comparticipação do Estado no preço dos medicamentos [21, 22].

## 5. Aprovisionamento e Armazenamento

Em qualquer sector económico a gestão de *stocks* reveste-se de uma importância fulcral para o bom funcionamento das empresas. A farmácia comunitária não é exceção. Se por um lado é necessário que exista um grande leque de medicamentos e outros artigos, capaz de satisfazer a grande maioria, se não todos, dos pedidos e receituários dos utentes, por outro é imperativo pré-definir, ajustar e reajustar o “stock” de forma particular para cada artigo, de acordo com as necessidades específicas em termos de dispensa e com a experiência adquirida no dia-a-dia minimizando, desta forma, custos e perdas desnecessários. É bem certo que, nesta área, as ruturas de “stock” podem abalar a confiança que o utente tem na farmácia pelo que é dada muita importância ao controlo rigoroso de todo este processo. Informaticamente, o sistema possibilita uma constante consulta e atualização do “stock” mínimo e máximo que, à partida, garantirá o equilíbrio necessário, que permita a satisfação do pedido do utente sem cair numa situação de excesso de “stock”. Esta funcionalidade é utilizada para produtos medicamentosos e exige um trabalho permanente por parte dos colaboradores da farmácia e, em particular, dos farmacêuticos que, da experiência do dia-a-dia, retiram também informação útil para o processo de gestão de “stock” como seja, por exemplo, os “hábitos” dos médicos prescritores locais. Para outro tipo de produtos, que não estejam diretamente relacionados com a saúde dos utentes por exemplo, o “stock” é ajustado de forma racional em termos de fatores como a capacidade de armazenamento, o aumento da procura de determinados produtos em função da estação do ano, características, hábitos e preferências dos utentes, lançamento de novos produtos e campanhas publicitárias nos meios de comunicação social, etc.

Neste sentido, é fácil perceber que o responsável desta área deve tentar garantir a continuidade na oferta, a qualidade dos produtos disponíveis e do atendimento, o conhecimento do mercado e dos fornecedores e um baixo custo de aquisição, de realização do pedido e de manutenção dos *stocks*, procurando o máximo retorno em todas as transações.

### 5.1. Encomendas

O Decreto-Lei nº176/2006 de 30 de Agosto determina que as farmácias só podem adquirir medicamentos a entidades autorizadas pelo INFARMED, como sejam

empresas de distribuição de medicamentos, armazéns grossistas ou os próprios laboratórios fabricantes. O INFARMED publica anualmente, na sua página eletrónica, a lista das entidades autorizadas [15]. Por norma, as farmácias possuem fornecedores previamente selecionados a quem realizam os pedidos dos diferentes produtos.

Na Farmácia São João, a seleção do fornecedor para aquisição dos diversos produtos de que dispõe é da responsabilidade do proprietário, em conjunto com a Direção Técnica, e está diretamente relacionada com alguns fatores associados, quer ao fornecedor, quer às características dos produtos a adquirir ou mesmo à urgência na receção, salientando-se, por exemplo, o número de entregas diárias, a rapidez e eficácia nas entregas, possíveis bonificações em determinados produtos, descontos financeiros e facilidades de pagamento, ou ainda, a facilidade na devolução de produtos.

Não obstante a existência de fornecedores “pré-definidos” a quem habitualmente são feitos os pedidos, pode surgir a necessidade de aquisição a outro, por diversas razões, o que pode ser feito sem qualquer problema, desde que respeitando as regras de aquisição estabelecidas na Lei.

A Farmácia São João trabalha com o armazém grossista OCP Portugal – Produtos Farmacêuticos, S.A.. O fornecedor tem entregas diárias previstas, com horários estabelecidos para a realização da entrega. Qualquer um dos colaboradores da farmácia pode realizar as encomendas.

### **5.1.1. Realização de Encomendas**

Na Farmácia São João as encomendas são realizadas duas vezes por dia, uma ao final da manhã e a outra ao final da tarde, próximo da hora de encerramento.

A realização de encomendas é um processo efetuado através do programa informático *Sifarma2000*. São gerados dois tipos distintos de encomendas, a diária - gerada automaticamente pelo sistema informático – e a manual – cujos produtos, quantidades e fornecedor são introduzidos pelo colaborador.

A funcionalidade “encomenda diária” está diretamente relacionada com o facto de o programa *Sifarma2000* atualizar automaticamente o “stock” durante a dispensa e conter, na “ficha de produto” de cada artigo, informação relativa ao “stock” mínimo e máximo desejado, ao fornecedor preferencial (fornecedor a quem vai ser encomendado o produto), ao preço, ao histórico de compras e vendas do produto, entre outra. Desta

forma, quando um artigo atinge o valor definido como “stock” mínimo ou inferior, é gerado uma proposta de encomenda, para o fornecedor que está previamente definido na “ficha de produto”, onde o sistema informático vai inserindo sucessivamente os produtos que se encontrem nessa situação, bem como o número de unidades a encomendar (que está relacionado com o *stock* máximo definido). Após este processamento automático, é necessário que o colaborador da farmácia verifique, aprove e valide a nota de encomenda e proceda ao seu envio ao fornecedor. A verificação é feita, artigo a artigo, mediante a análise do conjunto de informação (unidades a encomendar, *stocks* mínimo e máximo e histórico de vendas) que aparece na nota de encomenda e que permite que sejam feitos ajustes e correções antes da validação e envio ao fornecedor.

A funcionalidade “encomenda manual” requer a ação do colaborador da farmácia desde a sua geração até ao envio ao fornecedor. Neste caso, a nota de encomenda é gerada “de raiz” pelo funcionário que vai introduzindo os artigos e a quantidade necessária e a envia depois ao fornecedor a quem se destina.

No desenrolar do trabalho diário na farmácia, surgem por vezes situações em que é necessário transferir o pedido de determinado artigo de um fornecedor para outro, o que é possível e bastante útil. É também comum, na Farmácia São João, recorrer à página *web* do fornecedor (OCP) para acrescentar pedidos à próxima entrega a ser feita na farmácia, ou consultar, em tempo real, o “stock” existente no fornecedor e em que armazém o produto se encontra permitindo agilizar o processo de entrega. Por vezes são também efetuados pedidos via telefone, nomeadamente de produtos urgentes.

Durante a minha permanência na Farmácia São João acompanhei os seus colaboradores na execução destes procedimentos sem que, no entanto, os tenha realizado de forma independente. Todos os passos anteriormente descritos me foram transmitidos e explicados de forma bastante pormenorizada e com grande ênfase, mas, pela forma “diferente” como decorreu o meu estágio, não tive a oportunidade de os executar sozinha.

### **5.1.2. Receção, Conferência e Validação de Encomendas**

As encomendas são recebidas na Farmácia São João de manhã, antes da abertura da farmácia (uma encomenda), e ao início da tarde (as restantes). Os artigos vêm acondicionados em caixas retangulares plásticas fechadas, que permitem a sua boa

conservação de acordo com as regras estabelecidas (por exemplo, conservação no frio em caixas separadas com recurso a termoacumuladores) e estas são deixadas na antecâmara entre as portas de entrada exterior e interior (quando a farmácia está encerrada) ou entregues na zona de receção de encomendas (quando em horário de funcionamento da farmácia). A entrega da encomenda do armazém grossista OCP é feita diretamente pelos seus funcionários. Cada encomenda vem acompanhada da respetiva guia de remessa. Quando isso não acontece, é retirada uma cópia da página *web* do fornecedor. As faturas correspondentes aos artigos disponibilizados à farmácia são entregues posteriormente (com uma periodicidade quinzenal ou mensal). O colaborador confere a encomenda pela guia de remessa e dá entrada dela no sistema informático. As guias de remessa são rubricadas por quem realizou o processo e arquivadas.

O processo de conferência e validação das encomendas compreende uma sequência de passos importantes para uma correta gestão de “stock” dos produtos na farmácia. Este processo é efetuado informaticamente com a seguinte ordem de realização:

- Seleção da encomenda (fornecedor) da qual se quer dar entrada, introdução do número da guia de remessa e do seu valor total;
- Leitura do código de barras dos produtos, um a um, para dar entrada deles no sistema;
- Verificação e/ou retificação, para cada produto, dos seguintes dados: quantidade enviada, estado de conservação da embalagem, prazo de validade do artigo e Preços Impressos na Cartonagem (PIC), preço de venda ao público (PVP) e preço de venda à farmácia (PVF).

No período em que decorreu o meu estágio, e de forma algo irregular, fui executando esta tarefa, inicialmente acompanhada e depois sozinha, sempre com a máxima atenção e de acordo com as indicações que me haviam sido dadas logo na minha primeira semana de estágio. Assim, saliento alguns aspetos que tinha forçosamente que respeitar e assegurar:

- Dar prioridade à entrada de produtos sujeitos a condições de refrigeração para que pudessem ser arrumados, o quanto antes, no frigorífico;
- Verificar se as caixas dos medicamentos psicotrópicos e estupefacientes estavam completas e respeitar todos os procedimentos inerentes à sua entrada e posterior armazenamento de acordo com as regras legislativas existentes. Estes medicamentos são acompanhados por guias de identificação específicas com código de barras de leitura obrigatória pelo sistema informático e que contêm informação relativa ao produto e ao registo de entrada e de encomenda do medicamento pela farmácia;

- Para cada produto verificar se o prazo de validade do artigo de que estou a dar entrada é mais curto ou mais alargado do que o que consta no *Sifarma2000* relativo às embalagens que existem em *stock*. No caso de ser mais curto proceder à sua alteração (o prazo de validade que deve constar no sistema informático é sempre o mais curto);
- Introduzir de forma correta o PVF e o PVP, de acordo com os PIC, e proceder à sua alteração sempre que necessário de modo a que o PVF coincida com o que vem na guia de remessa;
- Imprimir “etiquetas de produto” (código de barras) para os artigos que não tenham PIC nem PVP previamente definido. Nestes casos é necessário calcular o valor de PVP de acordo com a taxa do Imposto sobre o Valor Acrescentado (IVA) estabelecida por lei (6% ou 23%) e a margem de comercialização da farmácia. Na etiqueta de código de barras deve constar o nome do produto, a taxa de IVA e o PVP;
- No caso de ser necessário dar entrada de um artigo novo, temos que abrir uma “ficha de produto” no *Sifarma2000* e introduzir a informação necessária e possível (definida no ponto 5.1.1 do presente relatório);
- Dar entrada de produtos que tenham sido encomendados por telefone ou na página *web* do fornecedor e que se fazem acompanhar de uma guia de remessa em separado. Nestes casos o procedimento tem que passar por criar uma encomenda manual, que é enviada em papel ao fornecedor e fica automaticamente acessível no menu de receção de encomenda ou, em alternativa, dar entrada dos produtos através da encomenda diária do fornecedor, mas indicando o número da guia de remessa específica;
- Por fim, mas não menos importante, verificar qualquer falha de entrega e averiguar o motivo dessa falha (ruptura de “stock” no fornecedor, produto descontinuado, entre outras). Pode ser necessário cancelar o pedido, transferir o pedido para outro fornecedor, ajustar a quantidade encomendada, etc.

### **5.1.3. Devolução de Produtos Rececionados**

Após a conferência e validação da encomenda podem surgir algumas situações que obriguem à devolução de algum produto ao fornecedor, como sejam, o mau estado da embalagem ou medicamentos danificados durante o transporte, o prazo de validade curto ou já expirado, o envio de produtos em excesso relativamente à quantidade encomendada, medicamentos ou outros produtos trocados, medicamentos enviados, mas não faturados ou medicamentos faturados a preço incorreto, etc. Sempre que surge uma situação destas, e antes de proceder à devolução, deve contactar-se o fornecedor e tentar perceber qual o motivo de tal ocorrência. Caso seja efetivamente necessário devolver algum produto, deve proceder-se à emissão de uma nota de devolução e

acondicionar os artigos numa caixa plástica fechada que garanta a sua boa conservação durante o transporte. A caixa far-se-á acompanhar da respetiva nota de devolução.

## **5.2. Armazenamento**

A partir da zona de receção de encomendas, e após o processo de entrada em *stock*, os diferentes produtos farmacêuticos são arrumados e armazenados de acordo com a sua distribuição na farmácia. Esta distribuição, definida anteriormente, procura ser de fácil acessibilidade e visibilidade e em adequadas condições de conservação, mantidas e controladas através de climatizadores e termohigrómetros para monitorização dos valores de temperatura e humidade. O local de armazenamento está indicado na “ficha de produto” no programa informático.

A ordem de arrumação é definida pelas condições especiais de armazenamento de determinados produtos: em primeiro lugar os que necessitam de refrigeração, depois os psicotrópicos e estupefacientes (para evitar que possam ser, por exemplo, extraviados) e por fim os produtos que não têm nenhum requisito especial. Todos os medicamentos e demais produtos de saúde são armazenados e dispensados segundo a premissa de “First Expired First Out” (FEFO) pelo que há o cuidado, por parte de todos os colaboradores da farmácia, de proceder à sua arrumação colocando o que apresenta um prazo de validade mais curto, “mais à frente” (no caso dos armários de gavetas deslizantes) ou “mais à esquerda” (no caso dos expositores de prateleiras horizontais). As localizações “mais à frente” e “mais à esquerda” são definidas em relação à posição do colaborador quando se encontra de frente para o local específico definido para o respetivo produto.

## **5.3. Controlo de Prazos de Validade**

Medicamentos e outros produtos de saúde cujo prazo de validade já tenha terminado, ou que termine durante o período de tratamento do utente, não podem ser dispensados. Se por um lado a sua existência representa um potencial risco para a saúde dos utentes, por outro traduz-se num prejuízo para a farmácia. Assim, nesta, como em todas as farmácias e de forma cada vez mais preponderante, é dada grande importância à verificação e controlo dos prazos de validade.

Na Farmácia São João, para além do controlo de prazos de validade efetuado como descrito no ponto anterior, mensalmente, são impressas do sistema informático, listagens de produtos cujo prazo de validade termina nos 3 e 5 meses seguintes. Depois de impressas as listagens (que contêm os códigos e nomes dos produtos, a quantidade em stock e a validade) os prazos de validade são verificados e, caso estejam incorretos e sejam mais alargados do que os registados no sistema, são corrigidos e os produtos mantêm-se no seu local de armazenamento. No caso do curto período de validade se confirmar, os produtos são colocados de parte para posterior avaliação da necessidade ou não de devolução ao fornecedor. Pode acontecer que, após análise do histórico de compra e venda, se considere ainda possível o escoamento do produto, não havendo necessidade de devolução. Os restantes, nomeadamente medicamentos, são devolvidos ao fornecedor que, caso aceite, emite uma nota de crédito ou procede à sua substituição por outro com prazo de validade mais alargado.

#### **5.4. Devoluções**

As situações descritas nos pontos 5.1.3 e 5.3 não são todas aquelas em que é necessário proceder a devoluções ao fornecedor por parte da farmácia. Por exemplo, uma outra situação, que acontece com alguma frequência, é a recolha de produtos do mercado por ordem do INFARMED ou do titular da AIM. Neste caso, é enviada à farmácia uma circular informativa que dá conta da situação e a farmácia atua em conformidade com o teor dessa informação (normalmente passa pela recolha imediata de determinados lotes de um determinado produto, sendo os artigos devolvidos ao fornecedor no mais curto espaço de tempo possível).

Em todos os casos descritos anteriormente devemos tentar contactar o fornecedor para resolução do problema e isso passa, também, pelo preenchimento de um “modelo de reclamação” de que a Farmácia São João dispõe e que ajuda os seus colaboradores a controlar as situações que já foram resolvidas e aquelas que ainda se encontram pendentes (verificação feita no final de cada mês).

Para se proceder à devolução de qualquer produto é necessária a emissão de uma nota de devolução onde é obrigatório constar o motivo da devolução. Nestes casos, à nota de devolução, é anexada uma cópia da guia de remessa ou fatura do produto e ambas são enviadas ao fornecedor, juntamente com os produtos, que são acondicionados por forma a garantir o seu correto transporte e conservação (um duplicado desta documentação fica arquivado na farmácia). Se o fornecedor aceitar a devolução procede

à substituição dos produtos ou emite uma nota de crédito. O farmacêutico deve, de seguida, regularizar a situação, quer atualizando o *stock*, quer dando baixa da correspondente reclamação que estava pendente. No caso de o fornecedor não aceitar a devolução, os produtos são enviados novamente à farmácia para que possa ser feita a quebra de produto através da VALORMED.

## **6. Interação Farmacêutico-Utente-Medicamento**

A Farmácia Comunitária, pela sua proximidade social, representa, muitas vezes, o espaço de eleição na procura de conselhos e indicações sobre medicamentos e outros produtos de saúde e mesmo meios complementares de diagnóstico, sendo que o Farmacêutico ocupa um lugar de destaque neste intercâmbio de informação. De acordo com o Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos [3]:

*“O exercício da atividade farmacêutica tem como objetivo essencial a pessoa do doente.”*

*“A primeira e principal responsabilidade do farmacêutico é para com a saúde e o bem-estar do doente e da pessoa humana em geral, ... e promover o direito das pessoas a terem acesso a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança”*

Desta forma, o farmacêutico comunitário deve ter consciência do importante papel que tem na correta interação do utente com o medicamento, deve procurar estar sempre atualizado e rodear-se de elementos de pesquisa que lhe permitam esclarecer quaisquer dúvidas com que se depare, deve manter sempre uma postura profissional e confiante, respeitando os princípios da ética e transmitindo informações corretas e pertinentes que irão contribuir para o estabelecimento de um elo de confiança entre o utente, a farmácia e os seus profissionais.

Durante o meu estágio pude constatar a importância desta dupla interação e desta inevitável transmissão de conhecimentos, bem como perceber a abrangência de conhecimentos que se impõe ao farmacêutico para que consiga prestar esclarecimento a todas as situações que lhe são apresentadas pelos utentes, e que são as mais variadas possíveis.

### **6.1. Recolha e Transmissão de Informação**

Nesta interação Farmacêutico-Utente, alguns aspetos são essenciais para que se possa prestar o melhor atendimento possível. Assim, tendo por base os princípios das boas práticas na farmácia comunitária [1, 2], os conhecimentos científicos e atuando sempre de forma correta e profissional, o farmacêutico deve:

- Antes de mais nada, tentar perceber quais as capacidades e/ou dificuldades do utente e adequar o discurso ao seu nível sociocultural;

- Prestar informação verbal e escrita relativa à posologia e modo de administração dos medicamentos;
- Perceber as preocupações do utente, nomeadamente em relação à correta utilização e contra-indicações dos medicamentos, e prestar os esclarecimentos necessários;
- Permanecer constantemente atento a situações que possam estar relacionadas com possíveis efeitos indesejados e reações adversas aos medicamentos;
- Indagar possíveis situações de polimedicação para que possa investigar possíveis interações e aconselhar em conformidade;
- Informar sobre a forma correta de conservação dos medicamentos, durante o transporte e no domicílio (em particular os que possuam condições especiais de conservação).

Toda esta partilha de informação deve ser bidirecional. Ao mesmo tempo que o farmacêutico deve tentar indagar o utente sobre determinadas situações nas quais possa intervir e ajudar, deve também ter o cuidado de transmitir, da forma mais perceptível possível, tudo o que considere essencial para a promoção do uso correto dos medicamentos e outros produtos de saúde contribuindo grandemente para o “estado de saúde”. Da minha experiência profissional, e agora também da experiência adquirida durante o estágio, saliento um pormenor que faz toda a diferença: sempre que transmitimos algum tipo de informação importante a um utente devemos, de seguida, pedir-lhe para repetir por palavras suas o que lhe dissemos. Se ele percebeu “a mensagem” saberá explicar, caso contrário ficará um pouco perdido e baralhado. Esta postura é fundamental, sobretudo com as pessoas de mais idade que, muitas vezes, até pelo simples facto de não ouvirem muito bem, dizem que sim a tudo, e quando vamos ver, não entenderam nada.

## **6.2. Princípios da Farmacovigilância**

De acordo com as Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária, define-se farmacovigilância como [2]:

*“a atividade de saúde pública que tem por objetivo a identificação, quantificação, avaliação e prevenção dos riscos associados ao uso dos medicamentos em comercialização, permitindo o seguimento dos possíveis efeitos adversos dos medicamentos”*

O Sistema Nacional de Farmacovigilância (SNF), coordenado pelo INFARMED, monitoriza a segurança dos medicamentos com AIM, avaliando eventuais Reações

Adversas a Medicamentos (RAM) e implementando medidas de segurança, se necessário. Neste contexto, o farmacêutico comunitário está numa situação privilegiada para o exercício de farmacovigilância, dada a sua proximidade ao doente, e deve comunicar o mais rápido possível qualquer RAM que tenha detetado.

Durante o meu estágio não assisti à comunicação de nenhuma RAM, no entanto, foi-me explicado o procedimento a seguir e mostrado o formulário que deve ser preenchido e encaminhado, tão rápido quanto possível, às autoridades de saúde (Unidade Regional de Farmacovigilância respetiva ou INFARMED) [15, 24]. O INFARMED disponibiliza também um serviço *on-line* para a notificação de RAM por parte de utentes e profissionais de saúde.

### **6.3. Reencaminhamento de Medicamentos Fora de Uso**

A Farmácia São João está integrada numa rede nacional de recolha de medicamentos fora de uso através da VALORMED - Sociedade Gestora de Resíduos de Embalagens e Medicamentos, Lda. O processo de recolha de medicamentos fora de uso começa com a sensibilização dos utentes para a importância da sua entrega em local apropriado (farmácias). A VALORMED garante a sua recolha segura e correto tratamento e destruição assegurando uma adequada gestão dos resíduos inerentes aos medicamentos e contribuindo para a redução do impacto ambiental.

Os medicamentos recolhidos pela farmácia são colocados em contentores próprios que, quando cheios, são selados e encaminhados à VALORMED acompanhados de uma ficha de registo cujo duplicado fica arquivado na farmácia.



## **7. Dispensa de Medicamentos e Outros Produtos de Saúde**

A dispensa de medicamentos e outros produtos de saúde disponíveis na farmácia é feita no *Sifarma2000* através do *menu* “Atendimento”. Esta funcionalidade permite, não só, realizar o processo de venda nas suas diversas formas (com ou sem comparticipação, venda suspensa, etc), mas também consultar informação útil a ter em conta no momento da dispensa (grupo homogêneo e informação científica relevante, confirmar rapidamente indicação, composição, posologia, modo de administração, contraindicações, interações e efeitos secundários) ou mesmo consultar o *stock* que é automaticamente atualizado.

A dispensa de medicamentos por parte do farmacêutico comunitário pode ser feita mediante a apresentação de uma receita médica válida de acordo com as normas existentes (no caso de MSRM), ou sem receita médica (no caso de MNSRM) [25]. Na primeira situação o farmacêutico avalia e interpreta a prescrição médica fazendo o seu enquadramento com a condição clínica do utente, podendo existir a necessidade de esclarecimento de alguma dúvida com o utente ou com o médico prescriptor. A segunda situação prevê a dispensa de MNSRM que só deve ser feita após o aconselhamento farmacêutico que se impõe à condição clínica descrita pelo utente. Em qualquer dos casos é da responsabilidade do farmacêutico instruir devidamente o utente sobre os cuidados a ter com os medicamentos, a sua correta utilização respeitando as indicações do médico quando aplicável, eventuais cuidados adicionais que possam ser necessários, a importância da adesão à terapêutica e a importância do uso racional dos medicamentos (sempre e só quando estritamente necessários).

### **7.1. Regimes de Comparticipação**

A apresentação de receita médica prevê a possibilidade de comparticipação por uma Entidade financeira responsável pelo subsistema de saúde do utente (para além do Sistema Nacional de Saúde – SNS, podem ser: ADSE, SAMS, Caixa Geral de Depósitos, etc.). Nestas situações, é estabelecida uma percentagem de comparticipação sobre o PVP dos medicamentos e o utente pagará apenas a diferença entre o valor pago pela Entidade e o PVP. Cada entidade apresenta diferentes percentagens de comparticipação.

No SNS, a comparticipação é estabelecida de acordo com o Regime Geral ou com o Regime Especial de Comparticipação. No Regime Geral a percentagem de comparticipação paga pelo Estado é estabelecida em função da classificação farmacoterapêutica e encontra-se dividida em escalões: Escalão A – 90%, Escalão B – 69%, Escalão C – 37%, Escalão D – 15%. O Regime Especial de comparticipação aplica-se a situações específicas, que abrangem determinadas patologias (patologias crónicas para as quais foram estabelecidas portarias e diplomas que modificam o regime de comparticipação e que o prescriptor deve, obrigatoriamente, mencionar na receita) ou grupos de doentes (por exemplo, pensionistas) [25, 26].

Na comparticipação de medicamentos pode ainda ocorrer uma situação de comparticipação em complementaridade entre um sistema principal e um subsistema do qual o utente seja beneficiário. Neste caso, e para efeitos de faturação, o original da receita é enviado à Entidade principal e a fotocópia é enviada à entidade responsável pelo subsistema (acompanhada pela fotocópia do respetivo cartão de beneficiário do utente).

Todas estas condicionantes estão devidamente contempladas no campo “Atendimento” do *Sifarma2000*.

## **7.2. Protocolos**

No campo das comparticipações há que referir alguns protocolos específicos, estabelecidos pelo SNS, e que definem as percentagens de comparticipação para medicamentos e dispositivos médicos destinados a situações particulares. Referem-se, por exemplo, os produtos destinados ao autocontrolo da diabetes *mellitus* e produtos dietéticos com carácter terapêutico [25].

É também frequente que a própria farmácia estabeleça protocolos e parcerias com determinados organismos e organizações nacionais e/ou locais e que podem contemplar, entre outras, percentagens de descontos em produtos previamente definidos, ações de formação e sessões de esclarecimento e divulgação. A Farmácia São João tem protocolos estabelecidos com a Liga dos Amigos dos Penedos Altos.

### **7.3. Dispensa de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica**

A classificação de Medicamentos Sujeitos a Receita Médica está subdividida em [15]:

- Medicamentos de receita médica renovável;
- Medicamentos de receita médica especial;
- Medicamentos de receita médica restrita, de utilização reservada a certos meios especializados.

Pretende-se, com esta classificação, restringir o acesso a medicamentos potencialmente perigosos quando utilizados sem vigilância médica, que tendam a ser utilizados com frequência e para condições diferentes do fim a que se destinam ou cuja atividade e reações adversas devam ser aprofundadas [15].

Como o próprio nome indica, estes medicamentos só podem ser dispensados mediante a apresentação, pelo utente, de uma receita médica válida que deve ser interpretada e avaliada em relação à situação clínica do utente a quem se destina e quanto à sua validade e autenticidade segundo as normas, ou seja, deve ter preenchidos corretamente os seguintes campos [25]:

- Número da receita;
- Identificação do médico prescriptor (nome clínico e número da cédula profissional – vinheta; outros dados, se aplicável);
- Local de prescrição (nome e código do local de prescrição – vinheta);
- Dados do utente (nome e número de utente do SNS; número de beneficiário da entidade financeira responsável, se aplicável; regime especial de participação: “R” - utentes pensionistas, “O” - utentes abrangidos por outro regime especial de participação identificado com referência ao respetivo diploma legal);
- Entidade financeira responsável (subsistema de saúde responsável pelo pagamento da participação da receita);
- Identificação do medicamento (prescrição por DCI, prescrição por marca);
- Posologia e duração do tratamento (dose de medicamento, intervalo de administração e duração do tratamento);
- Participações especiais;
- Número de embalagens (respeitando o número limite de medicamentos distintos e de embalagens por receita, nos seus diferentes formatos);

- Data da prescrição;
- Validade da prescrição (prazo de validade a partir da data de prescrição, variável consoante se trate de receita normal ou variável);
- Assinatura do médico prescriptor.

Durante o meu estágio na Farmácia São João, e antes de efetuar sozinha o processo de dispensa, foram-me chamando a atenção para a importância da correta validação da prescrição. No início parece que todos os olhos são poucos para tanta informação que é necessário confirmar, mas o processo acaba por se interiorizar e por fluir depois de forma natural. Neste período fui-me apercebendo de várias solicitações de utentes para a dispensa de MSRM sem a respetiva receita médica. Nestas situações os colaboradores da farmácia explicavam que não o poderiam fazer e tentavam fazer um aconselhamento farmacoterapêutico adequado. Apenas no final do estágio realizei o procedimento de dispensa sem supervisão.

Na dispensa de MSRM há uma situação em particular que merece destaque. Trata-se da dispensa de medicação crónica sem receita médica no momento (cedência em urgência). Para estes casos o sistema informático apresenta a possibilidade de fazer uma venda suspensa. É também ao sistema informático que recorremos para verificar o histórico do utente e comprovar que se trata, efetivamente, de medicação crónica. Claro que, tratando-se de uma farmácia com uma grande percentagem de utentes “fixos”, os colaboradores têm, à partida, a noção de se trata de medicação crónica ou não. Ainda assim, é sempre feita a confirmação. Tive também a oportunidade de acompanhar e executar este procedimento. Refiro ainda que, pelo exercício da minha atividade profissional num Laboratório de Análises Clínicas localizado na Covilhã e relativamente próximo da Farmácia São João, conheço muitos dos utentes da Farmácia, tendo daí a referência de algumas patologias associadas (por exemplo, doentes diabéticos). A venda suspensa permitida pelo *Sifarma2000* pode também ser utilizada quando falta algum dos medicamentos prescrito na receita médica.

Resta ainda referir uma situação particular do concelho da Covilhã ligada a uma atividade importante da sua história e, infelizmente, do seu passado recente – a Indústria dos Lanifícios. Para os pensionistas dos lanifícios foi criado um regime de comparticipação da totalidade dos medicamentos. Assim, as receitas apresentadas por estes utentes são faturadas ao SNS (regime especial de pensionista) e o valor a cargo do utente ser-lhe-á posteriormente devolvido. Para que isso aconteça, temos que fotocopiar a receita depois de finalizada (frente e verso), anexar o comprovativo de

pagamento (fatura) e dar ao utente para que este entregue no Centro de Saúde. O original da receita fica na farmácia para faturação ao SNS referente à percentagem de comparticipação. Grande parte dos atendimentos de dispensa por mim efetuados foram desta natureza.

#### **7.4. Dispensa de Medicamentos Genéricos**

A farmácia deve informar o utente da existência de medicamentos genéricos e respetivos preços e deve dispor, no mínimo, de 3 medicamentos com a mesma substância ativa, forma farmacêutica e dosagem, de entre os 5 de preço mais baixo pertencentes ao mesmo grupo homogéneo. Deve também ter em atenção que, tratando-se de medicação habitual do utente, o medicamento genérico a dispensar deve ser o mesmo que já tenha sido dispensado antes, ou seja, do mesmo laboratório [27].

Atualmente é obrigatória a prescrição por DCI, pelo que a dispensa de genérico, quando ele exista, está sempre contemplada. Existem, no entanto, algumas exceções previstas na lei que permitem a prescrição por marca comercial, com a devida justificação técnica do médico prescriptor. São o caso de medicamentos com índice terapêutico estreito, constantes em lista definida pelo INFARMED, reação adversa prévia e continuidade de tratamento superior a 28 dias [27].

O utente mantém sempre o seu direito de escolha, desde que o preço do medicamento de sua preferência seja igual ou inferior ao do medicamento prescrito. O *Sifarma2000* apresenta-nos as alternativas de dispensa disponíveis.

#### **7.5. Dispensa de Psicotrópicos e Estupefacientes**

A dispensa de medicamentos psicotrópicos e estupefacientes obedece a condições especiais, rigorosamente controladas e legisladas, devendo o farmacêutico registar informaticamente os seguintes dados [27] (que são, aliás, solicitados automaticamente pelo programa informático durante o atendimento):

- Identidade do utente ou do seu representante (nome, data de nascimento, número e data do bilhete de identidade ou carta de condução, ou o nome e número do cartão de cidadão, ou, no caso de estrangeiros, do passaporte);
- Identificação da prescrição através do número de prescrição;

- Identificação da farmácia (nome e número de conferência de faturas);
- Identificação do medicamento (número de registo e quantidade dispensada);
- Data de emissão da receita e de dispensa do medicamento.

O registo destas informações pelo *Sifarma2000* é importante uma vez que, periodicamente se faz o envio obrigatório de listagens ao INFARMED (Anexo 3). A farmácia deverá manter arquivo em suporte de papel ou digital, por um período de 3 anos, de todos os registos de envio obrigatório ao INFARMED [27], sendo que as receitas devem ser organizadas por data de dispensa. Importa salientar que estes medicamentos só podem ser prescritos em receitas onde não constem outros medicamentos; em cada receita podem ser prescritos até 4 medicamentos distintos, com um máximo de duas embalagens por medicamento, num total de 4 embalagens por receita.

## **7.6. Dispensa de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica e Automedicação**

Os MNSRM podem ser dispensados aos utentes sem a apresentação de uma receita médica, mas isso não quer dizer que não possam vir também prescritos em receita médica, por terem sido aconselhados pelo médico ao utente e para evitar qualquer erro de compreensão no nome ou posologia do medicamento. Estes medicamentos não estão sujeitos a comparticipação do Estado, exceto em situações previstas na legislação que define o regime de comparticipação do Estado no preço dos medicamentos, e que se prendem, normalmente, com questões de Saúde Pública. Nestes casos, ficam sujeitos ao regime de preços dos MSRM [28].

A dispensa de MNSRM segue o mesmo procedimento, em termos informáticos, já referido anteriormente sendo que, a transmissão de informação referente a posologia, modo de administração, interações, contraindicações e efeitos secundários, reveste-se de uma importância ainda maior do que no caso de MSRM, uma vez que o utente não ouviu do médico qualquer indicação nesse sentido.

O que acontece a maioria das vezes é que o utente se dirige à farmácia por sua iniciativa, na procura de tratamento farmacológico para determinada situação, e pede um ou mais MNSRM que pretende – Automedicação –, ou então a dispensa surge apenas após aconselhamento farmacoterapêutico por parte do farmacêutico.

No tempo que passei na farmácia tomei consciência da abrangência de conhecimentos necessária para que o farmacêutico consiga dar resposta a todas as situações que vão surgindo, não só em termos farmacológicos, mas também em termos fisiopatológicos e clínicos. Em termos de aconselhamento farmacêutico, os profissionais da Farmácia São João questionam sempre o utente quanto à sintomatologia, duração das queixas, medidas farmacológicas já iniciadas, possíveis doenças já diagnosticadas ao utente, e quaisquer outras informações que possam ser relevantes. Dessa forma, conseguem mais facilmente estabelecer a necessidade, ou não, de administração de um MNSRM, o recurso apenas a medidas não farmacológicas que são explicadas ao utente, a combinação entre MNSRM e medidas não farmacológicas, ou a necessidade de referenciação médica, quer por persistência dos sintomas, quer por se tratar de situações que necessitem da sua intervenção (por exemplo, infeções urinárias). O farmacêutico deve estar preparado para conseguir dar resposta e aconselhar em conformidade, deve conhecer as diversas situações passíveis de recurso a MNSRM e deve, acima de tudo, promover a segurança, eficácia e o uso racional dos medicamentos. Esta forma de trabalhar foi-me incutida desde logo e tive a oportunidade de a por em prática algumas vezes.

O aconselhamento ao utente em automedicação tem forçosamente que respeitar as indicações e especificações dos MNSRM e deve limitar-se a situações clínicas bem definidas, estabelecidas pelo Despacho nº17690/2007 de 23 de Julho [29].

## **7.7. Dispensa de Outros Produtos de Saúde**

O dia-a-dia de uma farmácia comunitária passa também pelo aconselhamento e dispensa de diversos produtos de saúde, para além dos medicamentos já referidos, que, embora possam estar disponíveis noutros locais, podem suscitar dúvidas no momento da sua aquisição. Desta forma, a farmácia torna-se o local de eleição para a sua aquisição, no sentido em que dispõe de profissionais com conhecimentos técnicos e científicos que possibilitam o esclarecimento dessas dúvidas e o melhor aconselhamento possível para determinadas situações e produtos específicos. Daquilo que pude constatar durante o estágio, neste campo tomam particular importância os produtos de cosmética e de higiene corporal, dietéticos, alimentação especial e alimentação infantil, suplementos alimentares, produtos fitoterápicos, medicamentos de uso veterinário e dispositivos médicos.

### **7.7.1. Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal**

O regime jurídico aplicável aos produtos cosméticos e de higiene corporal é estabelecido pelos Decretos-Lei nº189/2008 de 24 de Setembro e nº115/2009 de 18 de Maio (com algumas alterações contempladas mais tarde em outros 3 Decretos-Lei), que definem Produto Cosmético como [30, 31]:

*“qualquer substância ou preparação destinada a ser posta em contacto com as diversas partes superficiais do corpo humano, designadamente epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos, ou com os dentes e as mucosas bucais, com a finalidade de, exclusiva ou principalmente, os limpar, perfumar, modificar o seu aspeto, proteger, manter em bom estado ou de corrigir os odores corporais”*

Esta área é bastante vasta e exige uma atenção permanente por parte dos profissionais da farmácia, no sentido de adquirirem um conhecimento abrangente dos produtos disponíveis e indicados a cada situação. A Farmácia São João possui uma gama alargada de produtos cosméticos e de higiene corporal, de marcas cuidadosamente selecionadas e destinados a um aconselhamento e intervenção da máxima pertinência. Durante a duração do meu estágio percebi a importância que é dada a este sector sendo que, os colaboradores da Farmácia São João fazem formações frequentes, por forma a se manterem atualizados e capazes de prestar o melhor atendimento possível em todas as situações com que se deparem. É também frequente algumas marcas deslocarem à farmácia uma conselheira para secções de esclarecimento, formação e demonstração de algumas gamas de produtos. Os ensinamentos que me transmitiram nesta área foram também no sentido de identificar e distinguir entre situações passíveis de indicação de um produto dermocosmético de outras que exijam atenção e referenciação médica.

O INFARMED é a entidade que regula e supervisiona o mercado de produtos cosméticos em Portugal.

### **7.7.2. Produtos Dietéticos para Alimentação Especial**

O Decreto-Lei nº74/2010 de 21 de Junho do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, estabelece o regime geral aplicável aos géneros alimentícios destinados a uma alimentação especial [32], e define-os como:

*“géneros alimentícios que, devido à sua composição especial ou a processos especiais de fabrico, se distinguem claramente dos alimentos de consumo corrente, são adequados ao objetivo nutricional pretendido e comercializados com a indicação de que correspondem a esse objetivo”*

Como está subentendido na própria definição, estes produtos destinam-se a doentes cuja condição ou estado de saúde determinem necessidades alimentares e nutricionais especiais e que podem ser, por exemplo, situações de pós-operatório, síndromes gastrointestinais, mulher grávida, população geriátrica, desportistas, ou mesmo lactentes e crianças de 1 a 3 anos sem qualquer problema associado. Muitas vezes a necessidade prende-se apenas com o facto de apresentarem problemas de deglutição, digestão, metabolismo ou excreção ou então com o facto da sua situação clínica beneficiar com uma alimentação com determinadas características nutricionais.

Durante o meu estágio acompanhei apenas um atendimento para um produto destinado a um doente oncológico em fase terminal com dificuldade de deglutição. Foi-me transmitido que muitos destes produtos estão sujeitos a comparticipação pelo Estado, alguns deles em 100%.

### **7.7.3. Produtos Dietéticos Infantis**

Os produtos destinados à alimentação infantil têm muita procura nas farmácias, sobretudo por jovens mães e em se tratando do primeiro filho. Nestes casos a preferência pela aquisição na farmácia prende-se com o facto de procurarem aconselhamento e conselhos de utilização e nutrição por parte dos profissionais da farmácia. Nesta perspetiva, é muito importante que a farmácia disponha de uma vasta gama de produtos, de qualidade, para as diferentes etapas de crescimento e consiga manter-se atual no que diz respeito à evolução dos produtos e das recomendações alimentares para o melhor desenvolvimento das crianças. É também importante que os profissionais da farmácia estejam permanentemente informados e atualizados por forma a conseguirem prestar o melhor aconselhamento possível, com segurança e transmitindo uma sensação de confiança a quem procura as suas recomendações.

Durante o tempo em que estive no atendimento ao balcão constatei que, neste tipo de produtos, assumem uma importância acrescida os leites de transição, correspondendo à maior percentagem de produtos dietéticos infantis dispensados. O nosso aconselhamento, nestes casos, deve ter em conta a idade do bebé, o motivo pelo qual os pais vão optar por um leite de transição e qualquer situação clínica ou patológica associada já que, com as várias formulações que existem, devemos aconselhar aquela que mais se adequa à situação específica em causa (hipoalergénico, anti-obstipante, anti-regurgitante, anti-cólicas, saciante, etc.). Dada a minha condição de mãe, cheguei a ser questionada por utentes que conheciam esse facto, em relação à minha experiência pessoal questionando-me também sobre a correta preparação dos biberões, a sua esterilização, qual a água indicada à sua preparação, por quanto tempo se pode conservar o leite depois de preparado, etc. Não dispensei nenhum outro produto de alimentação infantil, mas a Farmácia São João dispõe de vários outros, como farinhas lácteas e não lácteas com ou sem glúten, diversos tipos de bolões (fruta, cereais, legumes, carne), etc.

#### **7.7.4. Fitoterapia e Suplementos Nutricionais (Nutracêuticos)**

Nos dias de hoje há uma tendência cada vez maior, por parte da população, em recorrer ao uso de suplementos nutricionais/alimentares, por diversos motivos e para diversas finalidades. A sua escolha é muito influenciada pela sugestão criada pelo marketing no sentido de serem produtos inovadores e que apresentam um grande benefício. No momento em que nós, profissionais de saúde, somos confrontados com pedidos de dispensa destes produtos, temos o dever de informar convenientemente acerca de possíveis efeitos indesejados, interações medicamentosas, reações adversas, sobredosagem, e lembrar que o recurso a um suplemento alimentar não invalida a prática de uma alimentação equilibrada e nutricionalmente adequada, que garanta o bom funcionamento do organismo. Apercebi-me durante o estágio que, no momento da escolha de um suplemento, pesa muito a publicidade nos meios de comunicação social, a recomendação feita por alguém conhecido ou mesmo o médico e o preço, e a procura da farmácia vai no sentido de solicitar ajuda e aconselhamento do farmacêutico, bem como esclarecimento de algumas dúvidas que possam ter. Apercebi-me também que a sua dispensa segue alguma sazonalidade, por exemplo, na primavera aumenta a procura por suplementos alimentares para o emagrecimento enquanto que em alturas de avaliações escolares aumenta a procura por suplementos direcionados para a fadiga e o stresse. Os suplementos nutricionais podem conter um leque bastante variado de substâncias nutrientes e outros ingredientes, designadamente vitaminas, minerais,

aminoácidos, ácidos gordos essenciais, fibras e várias plantas e extratos de plantas. A apresentação destes produtos, geralmente em comprimido ou cápsula, torna-os facilmente confundíveis com medicamentos, se bem que tendências de inovação tendem a substituí-los por bebidas e outros formatos mais apelativos [33].

Os produtos fitoterápicos são medicamentos à base de plantas, definidos no Estatuto do Medicamento como [15]:

*“qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas”*

As suas aplicações são diversas, sendo as mais comuns, e aquelas que tive oportunidade de acompanhar durante o estágio, problemas gastrointestinais, insónia, insuficiência venosa, emagrecimento e prevenção de estados inflamatórios e infecciosos. Por se tratar de produtos à base de plantas o utente tem muitas vezes a ideia errada de que não acarreta perigo para a saúde e descuida a sua utilização em segurança. Aqui é essencial o papel do farmacêutico no sentido de intervir ativamente no aconselhamento, oferecendo ao utente informação acerca dos efeitos terapêuticos e secundários, interações medicamentosas, posologia, duração do tratamento e alerta para possíveis ocorrências por prolongamento do tratamento ou aumento da dose recomendada e que garanta o seu uso em segurança. Durante os atendimentos que realizei, os produtos mais solicitados desta área formam as formulações contendo extratos de raiz de valeriana (Valdispert®) e produtos para a obstipação (Agiolax® e Pursennide®). Nesse período apercebi-me que muitos utentes trazem indicação médica para solicitar algumas destas formulações e para outras traziam mesmo prescrição médica (por exemplo, Daflon 500® e Permixon®).

Nestas gamas de produtos a Farmácia São João faz uma seleção rigorosa, com base em critérios de eficácia, segurança e qualidade, que lhe permite dispor de linhas de produtos que contribuam para o estado de saúde dos utentes, quando usados de forma correta e segundo as indicações do médico e/ou farmacêutico.

### **7.7.5. Medicamentos e Produtos de Uso Veterinário**

Os medicamentos de uso veterinário (MUV) e os produtos de uso veterinário (PUV) estão regulamentados pelos Decreto-Lei nº148/2008 de 29 de Julho e Decreto-Lei nº237/2009 de 15 de Setembro, respetivamente [34, 35].

Os medicamentos veterinários revestem-se da maior importância, como se pode verificar pelo exposto no Decreto-Lei nº148/2008 [34]:

*“... são um bem público e recursos cruciais para a defesa da saúde e do bem-estar dos animais e para a proteção da saúde pública, sendo igualmente um instrumento de salvaguarda das produções animais, com impacto considerável na economia das explorações agropecuárias e das alimentares”*

Durante o meu estágio não dispensei nenhum MUV, no entanto, acompanhei alguns atendimentos em que essa dispensa foi feita e apercebi-me que os medicamentos mais solicitados pelos utentes são os desparasitantes (internos e externos) e os anticoncepcionais para animais de companhia. Em termos de PUV são muito solicitados os produtos de higiene. Foi-me explicado que, embora alguns MUV necessitem de prescrição médico-veterinária (como é o caso dos antibióticos), nenhum é compartilhado, nem mesmo medicamentos de uso humano prescritos para uso em animais (aqui foi-me dado o exemplo do Alopurinol em comprimidos, usado na leishmaniose, em substituição de terapia específica de uso crónico que é cara).

### **7.7.6. Dispositivos Médicos**

O Decreto-Lei nº145/2009 de 17 de Junho estabelece o enquadramento legal dos dispositivos médicos (DM) [20] e define-os como:

*“qualquer instrumento, aparelho, equipamento, software, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, ..., cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de: Diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença; Diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência; Estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico; Controlo da concepção.”*

Os DM encontram-se divididos em quatro classes - I, IIa, IIb e III - tendo em conta a vulnerabilidade do corpo humano e atendendo aos potenciais riscos decorrentes da sua conceção técnica e do seu fabrico:

- Classe I: dispositivos de baixo risco
- Classe IIa: dispositivos de baixo médio risco
- Classe IIb: Dispositivos de alto médio risco
- Classe III: Dispositivos de alto risco

Como se pode subentender pela definição apresentada, estão incluídos nos dispositivos médicos uma grande diversidade de produtos, alguns com grande rotatividade e outros nem tanto, pelo que é importante que as farmácias consigam fazer uma adequada gestão de *stock* nesta área. É também importante que os profissionais conheçam as características e as especificações técnicas dos DM disponíveis na farmácia bem como os fins a que se destinam, de modo a realizarem uma dispensa adequada e prestando todos os esclarecimentos necessários.

A Farmácia São João possui um leque considerável de DM dos quais cito apenas alguns, divididos nas respetivas classes:

Classe I: pulsos, meias e joelheiras elásticas para fins médicos, sacos para colheita de urina, fraldas e pensos para incontinência, canadianas, algodão hidrófilo e ligaduras, seringas sem agulha, luvas de exame;

Classe IIa e IIb: compressas de gaze hidrófila, termómetros, medidores de tensão, seringas com agulhas e lancetas, canetas de insulina, preservativos masculinos, testes de gravidez;

Classe III: frascos para recolha de urina asséptica, pensos com medicamentos.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de acompanhar a dispensa de um pulso elástico e de dispensar material para penso, serinas sem agulha e testes de gravidez. Importa salientar que a dispensa de DM é sempre acompanhada de muita informação útil à boa utilização do dispositivo, em condições de segurança e garantindo a sua máxima eficácia.



## **8. Outros Cuidados de Saúde Prestados na Farmácia**

Qualquer farmácia comunitária, pela sua proximidade à população, deve tentar perceber quais são as maiores necessidades e carências dos utentes que serve e tentar ir de encontro a essas dificuldades, disponibilizando serviços e cuidados de saúde que as tentem colmatar. Nesse sentido, a Farmácia São João apresenta algumas ofertas, como sejam a medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos e consultas de nutrição e podologia.

De uma forma mais personalizada e privada, o atendimento para a medição de parâmetros bioquímicos e fisiológicos, nos quais se inclui também a tensão arterial, é feita no gabinete de atendimento destinado a esse fim. Nesse gabinete existe um medidor de tensão arterial e todo o material e utensílios necessários à avaliação dos parâmetros bioquímicos que a farmácia disponibiliza.

### **8.1. Parâmetros Antropométricos**

Como já referido anteriormente, a Farmácia São João dispõe de uma balança eletrónica que determina os parâmetros: peso, altura, IMC, índice de gordura, tensão arterial e ritmo cardíaco. Nesse processo, o utente é sempre acompanhado de um farmacêutico ou seu colaborador que o auxilia e lhe explica as diferentes fases que se vão sucedendo. No final o dispositivo emite um talão-resumo com o resultado das medições efetuadas. Após uma avaliação dos resultados o talão é entregue ao utente, mas não sem que antes lhe seja prestado esclarecimento sobre os resultados obtidos, bem como o que poderá ser feito para melhorar, se for caso disso, e as consequências de nada fazer. Os conselhos devem incidir, sobretudo, nas alterações ao nível do estilo de vida e hábitos alimentares com consequências benéficas, medicação e problemas de saúde associados ou, em situações mais complicadas, encaminhar para acompanhamento médico.

### **8.2. Medição da Tensão Arterial**

A medição da tensão arterial é um dos serviços mais solicitados na Farmácia São João, sobretudo pela população mais idosa, que é também, por norma, a mais polimedicada e

que necessita de uma atenção mais personalizada por parte da equipa de profissionais. Para esse efeito, além do dispositivo eletrónico a que se faz referência no ponto 8.1, a Farmácia São João dispõe de um medidor de tensão arterial *Omron M4*<sup>®</sup>, localizado num dos gabinetes de atendimento personalizado, e que é utilizado em situações nas quais o dispositivo eletrónico não esteja operacional ou em que ocorra algum erro durante a medição, em situações em que o utente não reúna as condições necessárias à medição em dispositivo eletrónico (por exemplo, se tiver um “pacemaker”) ou sempre que o utente manifeste ser essa a sua preferência. Em qualquer dos casos há algumas normas de procedimento a ter em conta: questionar o utente se tomou café ou fumou na meia hora anterior, questionar o utente se se dirigiu até à farmácia a pé e pedir-lhe que descanse, sentado, aproximadamente 5 minutos para regularizar o ritmo cardíaco, questionar o utente sobre a presença de “pacemaker” ou qualquer outro dispositivo cardíaco (o que impossibilita a medição em equipamento eletrónico), solicitar a remoção de relógio ou outros acessórios que possam apertar de alguma forma o braço onde se vai proceder à medição.

Nas situações em que se recorre ao tensiómetro *Omron M4*<sup>®</sup>, a medição é realizada pelo farmacêutico de serviço e obedece a um procedimento criterioso que inclui os seguintes passos:

- Garantir que o utente se mantenha relaxado e tranquilo durante a medição, sem falar nem fazer nenhum movimento; o utente não deve também ter fumado nem comido ou ingerido nenhuma bebida energizante (cafeinada) na meia hora anterior à medição; não deve também ter praticado exercício físico na última hora antes da medição; se o utente se deslocou a pé até à farmácia deve ser aconselhado a sentar e aguardar, pelo menos, 5 minutos antes da medição, para permitir a estabilização do ritmo cardíaco;
- Questionar o utente relativamente a patologias associadas e à toma de medicação (MSRM ou MNSRM) e ter em atenção que alguns medicamentos podem interferir no valor da tensão arterial;
- Fazer uma primeira medição em ambos os braços para selecionar o braço de referência (o que dá um valor mais elevado – o utente pode já saber qual o seu braço de referência);
- Apoiar o braço na mesa, sensivelmente ao nível do coração, e prepará-lo para o procedimento garantindo que está livre de vestuário obstrutivo a apertado;
- Introduzir a braçadeira do equipamento de medida no braço, ajustando-a de forma a que a extremidade inferior fique 2-3 cm acima da prega do cotovelo e o tubo flexível da braçadeira esteja na direção da artéria braquial;
- Premir o botão “start” para iniciar o processo de leitura (a braçadeira é insuflada);

- Aguardar pelos resultados (tensão arterial e pulsação) e registá-los, ou não, em local próprio, de acordo com a preferência do utente; pode também ser feito o registo no *Sifarma2000*, caso o utente tenha acompanhamento na farmácia;
- Realizar mais do que uma leitura (geralmente duas) para garantir a certeza dos resultados;
- Tendo em conta os resultados obtidos, prestar alguns esclarecimentos ao utente, fornecendo-lhe conselhos úteis, nomeadamente no que diz respeito à adesão à terapêutica anti-hipertensora (se for o caso), aos ajustes à medicação por iniciativa própria ou à automedicação, lembrando importância da indispensável consulta médica.

Durante o meu estágio tive a oportunidade de realizar algumas avaliações de tensão arterial, quer por acompanhamento aos utentes na balança eletrónica, quer por medição no tensiómetro *Omron M4*<sup>®</sup>. Não tendo detetado nenhuma situação crítica que exigisse uma medida mais urgente, como o contacto com o médico assistente do utente ou mesmo o seu encaminhamento para o hospital, deparei-me, ainda assim, com uma diversidade de situações que me permitiram pôr em prática muitos dos conhecimentos adquiridos ao longo do MICF e do estágio, como sendo, situações de hipotensão, hipertensão controlada e não controlada em utentes medicados e hipertensão em utentes não medicados. Penso que os meus esclarecimentos e aconselhamentos foram uma mais-valia para o utente.

### **8.3. Medição de Parâmetros Bioquímicos Fisiológicos**

Os parâmetros bioquímicos e imunológicos que o utente pode avaliar na Farmácia São João são: glicémia capilar, colesterol total, triglicéridos, ácido úrico e gonadotrofina coriónica humana (teste de gravidez). Para os três primeiros é pedido ao utente que se apresente em jejum uma vez que a ingestão de alimentos interfere com os resultados. A Farmácia São João disponibiliza aos seus colaboradores tabelas-resumo de valores de referência de alguns dos parâmetros analisados (Anexo 4).

A medição da glicémia, colesterol, triglicéridos e ácido úrico é efetuado por um teste rápido (tecnologia “point-of-care”) em sangue capilar e segue um mesmo protocolo em todos os casos: desinfeção da zona de punção (zona lateral de um dos dedos), punção cutânea com uma lanceta para obtenção de uma gota de sangue, recolha da gota de sangue numa tira de teste previamente colocada no aparelho, aguardar alguns segundos pelo resultado fornecido pelo equipamento, em mg/dL. Tratando-se de testes invasivos,

que implicam possível contacto com produto biológico (sangue), devemos ter o cuidado de utilizar luvas e descartar o material utilizado para recipientes específicos de acordo com a categoria. Os resultados obtidos são analisados e registados em local próprio, de acordo com a preferência do utente; pode também ser feito o registo no *Sifarma2000*, caso o utente tenha ficha e acompanhamento na farmácia.

Tal como acontece no caso da avaliação da tensão arterial, também nestas situações são prestados aconselhamentos e esclarecimentos ao utente, que contribuam para a melhoria da sua saúde e por inculcar a necessidade de adoção de hábitos de vida saudáveis, que passem por uma alimentação equilibrada e a prática de exercício físico. É também dada atenção a possíveis situações de não adesão à terapêutica prescrita ou de automedicação, sendo recomendada a consulta médica sempre que se perceba necessária.

Durante o estágio não tive a oportunidade de realizar nenhum destes testes. No entanto, foram-me reportadas algumas situações de intervenção dos colaboradores da farmácia neste contexto.

Em relação aos testes de gravidez, trata-se também de um teste rápido, do tipo “point-of-care”, em urina. Apesar de puderem ser realizados na farmácia, a maior parte dos utentes opta pela sua aquisição e posterior realização no domicílio pelo que também não realizei nem acompanhei a realização de nenhum.

#### **8.4. Serviço de Distribuição Domiciliária**

A Farmácia São João dispõe de um serviço de entregas ao domicílio de medicamentos e outros produtos, em viatura própria destinada a esse efeito.

As condições e requisitos da dispensa de medicamentos ao domicílio são reguladas pela Portaria nº1427/2007 de 2 de Novembro [36] que permite às farmácias e aos locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica dispensarem medicamentos aos utentes, ao domicílio, podendo o pedido ser feito através do telefone ou da Internet, para além de presencial. No entanto, a mesma Portaria limita a entrega ao domicílio de MSRM aos profissionais que os podem dispensar nas farmácias e de MNSRM aos profissionais que os podem dispensar nos locais de venda de MNSRM, e obriga à supervisão de um farmacêutico, no caso de a dispensa ser efetuada por uma farmácia, ou de um farmacêutico ou técnico de farmácia, no caso de a dispensa ser efetuada por

um local de venda de MNSRM. Em qualquer dos casos a informação necessária à adequada utilização do medicamento tem obrigatoriamente que ser transmitida no momento da entrega e é da responsabilidade do Diretor Técnico da farmácia ou do Responsável Técnico do local de venda de MNSRM, consoante o caso. Assim, as condições de entrega de medicamentos ao domicílio são as seguintes:

- A entrega ao domicílio de MSRSM observa as disposições legais aplicáveis em relação à obrigatoriedade de apresentação de receita médica;
- A dispensa de medicamentos com entrega ao domicílio está limitada ao município onde se encontra instalada a farmácia e aos municípios limítrofes;
- A entrega de medicamentos ao domicílio só pode ser assegurada pela farmácia ou, no caso de medicamento não sujeito a receita médica pelo local autorizado à respetiva venda, onde o medicamento é solicitado;
- Ao transporte de medicamentos até ao domicílio do utente são aplicáveis, com as necessárias adaptações, as regras de transporte previstas nas boas práticas de distribuição de medicamentos.

Quem disponha deste serviço deve facultar ao INFARMED os registos dos pedidos de dispensa, com referência à identificação do medicamento, à quantidade dispensada e ao município onde foi entregue, sempre que solicitado.

Durante o estágio não fiz nenhuma entrega ao domicílio, mas acompanhei e participei no processo de execução deste serviço.

## **8.5. Administração de Injetáveis**

A farmácia São João disponibiliza o serviço de administração de injetáveis, dos quais fazem parte as vacinas não incluídas no Plano Nacional de Vacinação, por dois farmacêuticos, devidamente habilitados por formação certificada para o fazer.

Durante o estágio não acompanhei nenhuma administração de injetáveis.

## **8.6. Consultas e Serviços de Especialidade**

A Farmácia São João disponibiliza aos seus utentes consultas de podologia e nutrição nas suas instalações, mediante marcação prévia.

Durante o período em que estive na farmácia constatei que estas consultas podem ser marcadas de duas formas distintas: por iniciativa do utente que sabe que a farmácia disponibiliza o serviço e manifesta interesse em ser visto e acompanhado por um especialista; ou como resultado do seguimento e acompanhamento por parte do farmacêutico que, conhecendo o histórico dos seus utentes habituais pode referenciar algum deles para uma destas consultas, com a sua concordância. Verifiquei também que a consulta com maior adesão é a de podologia, sobretudo por parte da população idosa e de doentes diabéticos como forma de acompanhamento e/ou prevenção do pé diabético.

Recentemente a farmácia introduziu também o serviço de mini-faciais e massagens de relaxamento que tem despertado mais interesse na população jovem. Este serviço é realizado por uma técnica de farmácia que fez formação adequada para o poder realizar.

## **9. Contabilidade e Gestão**

As atividades de Gestão e Contabilidade, no contexto da Farmácia Comunitária, são, cada vez mais, da maior importância, para o bom funcionamento da farmácia e para que consiga o melhor desempenho possível das funções e da prestação dos serviços farmacêuticos. É por isso necessário que todos os colaboradores se envolvam neste processo de forma ativa e com o máximo empenho, por forma a evitar erros e a minimizar custos deles decorrentes. A validação e supervisão deste processo são realizadas por um farmacêutico.

### **9.1. Legislação Laboral no Contexto da Farmácia Comunitária**

A legislação laboral aplicada aos Farmacêuticos encontra-se estabelecida no Contrato Coletivo de Trabalho (CCT) assinado entre a ANF e o Sindicato Nacional dos Farmacêuticos, publicado no Boletim do Trabalho e Emprego, nº23 de 22 de Junho de 2012. O referido CCT define, entre outras, Admissão e Enquadramento Profissional, Deveres, Prestação de Trabalho, Retribuições e Outras Prestações Pecuniárias, Formações [37]. Em relação aos Técnicos de Farmácia e demais profissionais encontra-se em vigor o CCT publicado no Boletim do Trabalho e Emprego nº21 de 8 de Junho de 2010, estabelecido entre a ANF e o Sindicato Nacional dos Profissionais de Farmácia [38].

### **9.2. Processamento do Receituário e Faturação**

As farmácias comunitárias, para que possam ser restituídas do valor da comparticipação dos medicamentos, têm que enviar o receituário às entidades financeiras responsáveis pela comparticipação. Esse envio é feito no final de cada mês e após conferência e organização das receitas por entidade.

Logo desde o início do meu estágio me foi transmitida a importância deste processo, uma vez que, caso esteja alguma coisa incorreta na prescrição, ela é devolvida pela entidade responsável pela comparticipação, impossibilitando o seu reembolso e

tornando-se um prejuízo para a farmácia. Desde cedo acompanhei o processo de conferência que está estabelecido na Farmácia São João:

- No momento logo após a dispensa cada colaborador faz uma primeira conferência rápida por forma a detetar algum erro;
- No final do dia cada colaborador confere novamente todas as suas receitas;
- As receitas nas quais seja detetado algum erro, são colocadas de parte para que o farmacêutico responsável pela correção de receituário possa atuar em conformidade (pode ser necessário contactar o utente);
- As receitas são novamente conferidas pelo farmacêutico responsável e, quando tudo está correto, são assinadas e separadas por lotes e entidades de participação. Quando há necessidade de correção da receita é feita uma reimpressão do verso que tem que ser devidamente justificada e assinada.

Verifiquei que, muitas vezes, as inconformidades encontradas se relacionam com o prazo de validade, a falta da assinatura do médico prescriptor e situações de ilegibilidade por falha de impressão.

Para além da verificação dos campos descritos no ponto 7.3, a conferência do receituário implica ainda a confirmação, no verso da receita, de:

- Organismo de faturação (tem que corresponder ao que vem na receita);
- Códigos de barra impressos (têm que coincidir com os medicamentos prescritos);
- Preços faturados (têm que estar atualizados e corretamente introduzidos no sistema).

O *Sifarma2000* imprime no verso da receita o documento de faturação que inclui o número de lote da receita (cada lote só pode ter 30 receitas e apenas o último lote pode ficar incompleto), identificação da farmácia; data; código do operador e da entidade responsável pela participação; letra de série do mês e número da receita; nome do medicamento, código, dosagem, forma farmacêutica e quantidade dispensada; PVP, participação, preço a pagar pelo utente e preço de referência.

No final de cada mês são impressos os verbetes de identificação dos lotes (resumo das receitas do lote) para serem carimbados e anexados ao respetivo lote de receitas. É também no final do mês que se emite a Relação Resumo de Lotes de cada entidade e a respetiva Fatura Mensal de Medicamentos, onde se encontra discriminado o valor das participações a pagar à farmácia. Estes documentos são enviados, conjuntamente com os lotes, às respetivas entidades responsáveis pela participação. No que diz respeito ao SNS o envio é feito ao Centro de Conferência de Faturas (CCF) e, em relação às restantes entidades, o envio é feito à ANF que posteriormente os remete para cada

uma das entidades responsáveis (ADSE, Caixa Geral de Depósitos, PSP, Sindicato dos Bancários do Sul e Ilhas, etc.).

Antes de proceder ao respetivo reembolso às farmácias, cada uma das entidades responsáveis pela comparticipação confere as receitas e as faturas que lhe foram enviadas. Receitas em situação de não conformidade, por erros de aviamento, faturação ou comparticipação, são devolvidas à farmácia devidamente acompanhadas de um documento com o resumo do valor das receitas contendo erro e a justificação de devolução de cada uma delas. Cabe então à farmácia proceder a sua correção, se possível, de modo a regularizar a situação e incluir essas receitas na faturação do mês seguinte.

### **9.3. Documentos Contabilísticos**

A farmácia comunitária, sendo um local de prestação de cuidados de saúde, não deixa também de ser um estabelecimento comercial, que se rege por regras comuns a todos os outros, no que diz respeito às obrigações legais em termos contabilísticos e fiscais, e os seus profissionais são confrontados com diversos tipos de documentos que precisam conhecer e saber caracterizar, nos seus aspetos funcionais e legais, para o bom funcionamento da farmácia. Assim, saliento:

- Guia de Remessa: acompanham os produtos do distribuidor à farmácia e permitem conferir a encomenda;
- Fatura: documento comercial que justifica a compra/venda de produtos. Deve discriminar os produtos, quantidades, preços e taxas de IVA;
- Nota de Crédito: documento comercial enviado na sequência da receção de uma nota de devolução e que comprova que o comprador possui crédito no vendedor
- Recibo: comprovam a transação/pagamento efetuado;
- Nota de Devolução: emitida no processamento de uma devolução, acompanha produtos devolvidos e deve conter identificação, enumeração dos itens, preços, taxas de IVA e motivo;
- Inventário: contagem e verificação de todos os produtos em *stock* na farmácia;
- Balancete: demonstrativo de todos os débitos e créditos da farmácia, permite uma avaliação contínua da sua situação económica (realizado mensalmente pelo contabilista).

Todos estes documentos me eram já familiares uma vez que lidava frequentemente com eles, enquanto técnica superior em laboratório de análises clínicas, pelo que o seu reconhecimento e manuseamento foram acessíveis.

#### **9.4. Incidência Fiscal no Contexto da Farmácia Comunitária**

No contexto da farmácia comunitária, e à semelhança do que acontece noutras sectores de atividade, aplicam-se 3 impostos: o IVA que é aplicado ao PVP dos produtos transacionados e que a farmácia devolve ao Estado; o Imposto sobre o Rendimento de pessoas Singulares (IRS) relativo ao ordenado de todos os colaboradores da farmácia e o Imposto sobre o Rendimento de pessoas Coletivas (IRC) que é calculado anualmente pelas finanças fazendo a reconciliação entre contribuições e despesas (à semelhança do que acontece no caso de pessoas singulares).

#### **9.5. Documentação Relativa a Psicotrónicos e Estupefacientes**

A medicação psicotrónica e estupefaciente é aquela que exige mais rigor na sua aquisição, armazenamento e dispensa, sendo também a mais fortemente regulada pelo INFARMED. Nesse sentido, as farmácias estão obrigadas ao envio periódico de alguns documentos aquela entidade (Anexo 3). Devem também manter todos os documentos em arquivo durante 3 anos.

## 10. Considerações Finais

Durante o meu percurso académico no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas estive sempre na expectativa de como seria o estágio curricular final. A minha condição de trabalhador-estudante impunha-me algumas limitações, nomeadamente em termos de horários. Não foi fácil conciliar, arrastou-se no tempo mais do que devia, condicionou algumas interações e aprendizagens, mas apesar de todas as dificuldades, foi compensador e gratificante. A Farmácia São João e os seus profissionais tornaram essa tarefa mais fácil do que seria espectável, aceitaram as minhas condições sem levantar obstáculos e permitiram-me uma adaptação natural ao dia-a-dia da farmácia adaptando-se, também eles, à minha assiduidade muito própria e sempre com uma disponibilidade imensa para me transmitirem todos os ensinamentos necessários à minha evolução. Foi com a sua ajuda que consegui por em prática muito do que aprendi no MICEF e também muito daquilo que é a minha experiência pessoal e profissional, quer no que diz respeito ao atendimento, à forma de comunicar com as pessoas e de lhes transmitir toda a informação necessária e até a alguns esclarecimentos que me foram sendo solicitados por utentes conhecedores da minha atividade profissional.

O estágio na Farmácia São João deu-me a conhecer o outro lado da farmácia comunitária (que até agora só conhecia como utente), da importância que tem para a população que serve, da qualidade dos serviços que presta, da responsabilidade com que os seus profissionais desempenham as suas tarefas, tendo sempre por base a salvaguarda da pessoa, do doente e do seu estado de saúde e tentando inculcar em todos o uso dos medicamentos de forma responsável, racional e em segurança.

O contacto com os vários sectores de atividade dentro da farmácia - o circuito do medicamento, o atendimento, o aconselhamento na dispensa, a medição de parâmetros fisiológicos e bioquímicos, a participação nas atividades de gestão, aprovisionamento e faturação, a administração de injetáveis, a pesquisa constante de informação para fazer acompanhar a prestação de um qualquer cuidado de saúde da respetiva explicação que possa ser pertinente e o contacto com uma vasta gama de produtos de saúde que não medicamentos - permitiu-me perceber a abrangência de conhecimentos técnico-científicos que o farmacêutico deve possuir e a necessidade de se manter permanentemente atualizado, realizando, por exemplo, ações de formações periódicas e momentos de pesquisa e autoaprendizagem.

Estou certa de que esta experiência enriquecedora será uma mais-valia para o meu futuro enquanto profissional de saúde, nesta ou noutra área.

## 11. Referências Bibliográficas

1. OF, ANF, GFUE. Boas Práticas de Farmácia para Portugal. 2ª Edição. 2001.
2. OF – Departamento da Qualidade. Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária (BPF). Conselho Nacional da Qualidade da Ordem dos Farmacêuticos. 3ª Edição. 2009.
3. OF. Código Deontológico. Aprovado em Assembleia Geral de 28.03.1998.
4. INFARMED – Gabinete Jurídico e Contencioso. Deliberação nº2473/2007, de 28 de novembro (Revogado pela Deliberação nº1502/2014, de 3 de Julho) - Aprova os regulamentos sobre áreas mínimas das farmácias de oficina e sobre os requisitos de funcionamento dos postos farmacêuticos móveis. Legislação Farmacêutica Compilada.
5. Duarte, A., Nunes, F., Martins, L. Responsabilidade Social no Sector das Farmácias em Portugal. Ordem dos Farmacêuticos (Entidade contratada GEST-IN/ISCTE), 2009.
6. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº307/2007, de 31 de agosto – Estabelece o Regime Jurídico das Farmácias de Oficina. Diário da República 1ª Série, Nº168, de 31 de agosto de 2007, pag. 6083.
7. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº171/2012, de 1 de Agosto – Procede à Segunda Alteração ao Decreto-Lei n.º307/2007, de 31 de agosto, alterado pela Lei n.º26/2011, de 16 de junho, que Estabelece o Regime Jurídico das Farmácias de Oficina. Diário da República 1ª Série, Nº148, de 1 de agosto de 2012, pag. 4030.
8. INFARMED. Deliberação nº414/CD/2007, de 29 de outubro de 2007.
9. Amaral, J., Valente, M., Santos, H. J., Iglésias, P., Águas, Y., Fernández-Llimós, F. Avaliação da resposta dos Centros de Informação de Medicamentos de Portugal perante um caso clínico de Seguimento Farmacoterapêutico. *Seguim Farmacoter*, 2004, 2(3): 137-152.
10. [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/CONTACTOS/ATENDIMENTO\\_ESPECIALIZADO/CENTRO\\_DE\\_INFORMACAO](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/CONTACTOS/ATENDIMENTO_ESPECIALIZADO/CENTRO_DE_INFORMACAO), consultado a 09/02/2015.
11. [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/CONTACTOS/ATENDIMENTO\\_ESPECIALIZADO/BIBLIOTECA](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/CONTACTOS/ATENDIMENTO_ESPECIALIZADO/BIBLIOTECA), consultado a 09/02/2015.

12. [http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid//ofWebInst\\_09/defaultCategoryViewOne.asp?categoryID=2015](http://www.ordemfarmaceuticos.pt/scid//ofWebInst_09/defaultCategoryViewOne.asp?categoryID=2015), consultado a 09/09/2015.
13. [http://www.anf.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=38](http://www.anf.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=38), consultado a 09/10/2015.
14. <http://www.chuc.min-saude.pt/media/SiMEG.pdf>, consultado a 09/02/2015.
15. INFARMED – Gabinete Jurídico e Contencioso. Decreto-Lei nº176/2006, de 30 de agosto – Estatuto do Medicamento. Legislação Farmacêutica Compilada.
16. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº314/2009, de 28 de outubro. Diário da República 1ª Série, Nº209, de 28 de outubro de 2009, pag. 8106.
17. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto Regulamentar nº11/2007, de 27 de fevereiro. Diário da República 1ª Série, Nº41, de 27 de fevereiro de 2007, pag. 1378.
18. INFARMED. Saiba mais sobre: Psicotrópicos e Estupefacientes. Edição 22, abril 2010.
19. INFARMED. Gabinete Jurídico e Contencioso. Decreto-Lei nº15/93, de 22 de janeiro – Regime jurídico do tráfico e consumo de estupefacientes e psicotrópicos. Legislação Farmacêutica Compilada.
20. INFARMED. Gabinete Jurídico e Contencioso. Decreto-Lei nº145/2009, de 17 de junho - Estabelece as regras a que devem obedecer a investigação, o fabrico, a comercialização, a entrada em serviço, a vigilância e a publicidade dos dispositivos médicos e respetivos acessórios e transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva nº2007/47/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de setembro. Legislação Farmacêutica Compilada.
21. INFARMED. Gabinete Jurídico e Contencioso. Despacho do Ministério da Saúde nº6914/98, de 24 de março - Classificação farmacoterapêutica dos medicamentos. Legislação Farmacêutica Compilada.
22. INFARMED. Gabinete Jurídico e Contencioso. Despacho nº21 844/2004, de 12 de outubro - Homologa a classificação farmacoterapêutica de medicamentos. Legislação Farmacêutica Compilada.
23. WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. *Guidelines for ATC classification and DDD assignment 2013*. Oslo, 2012.

24. Inês Ribeiro Vaz. *Farmacovigilância. Sistema Nacional de Farmacovigilância. Notificação Espontânea de RAM*. Unidade de Farmacovigilância do Norte, 2012.
25. Ministério da Saúde, INFARMED, ACSS. *Normas Relativas à Dispensa de Medicamentos e Produtos de Saúde*. Versão 4.0 de 29/10/2015.
26. [http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS\\_USO\\_HUMANO/AVALIACAO\\_ECONOMICA\\_E\\_COMPARTICIPACAO/MEDICAMENTOS\\_USO\\_AMBULATORIO/MEDICAMENTOS\\_COMPARTICIPADOS/Dispensa\\_exclusiva\\_em\\_Farmacia\\_Oficina](http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_ECONOMICA_E_COMPARTICIPACAO/MEDICAMENTOS_USO_AMBULATORIO/MEDICAMENTOS_COMPARTICIPADOS/Dispensa_exclusiva_em_Farmacia_Oficina), consultado a 14/10/2015
27. Ministério da Saúde. Portaria nº224/2015, de 27 de julho. Diário da República, 1.ª Série, Nº144, de 27 de julho de 2015, pag. 5037.
28. INFARMED. Gabinete Jurídico e Contencioso. Portaria nº713/2000, de 5 de setembro Regime de preços dos medicamentos não sujeitos a receita médica. Legislação Farmacêutica Compilada.
29. INFARMED. Gabinete Jurídico e Contencioso. Despacho nº17690/2007, de 23 de julho - Revoga o anexo ao Despacho nº2245/2003, de 16 de janeiro - lista das situações de automedicação. Legislação Farmacêutica Compilada.
30. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº189/2008, de 24 de setembro. Diário da República, 1.ª Série, Nº185, de 24 de setembro de 2008, pag. 6826.
31. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº115/2009, de 18 de maio. Diário da República, 1.ª Série, Nº95, de 18 de maio de 2009, pag. 3127.
32. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº74/2010, de 21 de junho. Diário da República 1ª Série, Nº118, de 21 de junho de 2010, pag. 2198.
33. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº136/2003, de 28 de junho. Diário da República 1ª Série A, Nº147, de 28 de junho de 2003, pag. 3724.
34. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº148/2008, de 29 de julho. Diário da República 1ª Série, Nº145, de 29 de julho de 2008, pag.5048.
35. Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Decreto-Lei nº237/2009, de 15 de setembro. Diário da República 1ª Série, Nº179, de 15 de setembro de 2009, pag.6473.

36. Ministério da Saúde. Portaria nº1427/2007, de 2 de novembro. Diário da República, 1.ª Série, Nº211, de 2 de novembro de 2007, pag. 7991.
37. Ministério do Trabalho e da Solidariedade Social. Contrato coletivo de trabalho entre a ANF — Associação Nacional das Farmácias e o SNF — Sindicato Nacional dos Farmacêuticos — Revisão global. Boletim do Trabalho e Emprego, nº23, 22/6/2012.
38. Ministério do Trabalho e da Solidariedade Social. Contrato coletivo de trabalho entre a ANF — Associação Nacional das Farmácias e o SINPROFARM — Sindicato Nacional dos Profissionais de Farmácia — Revisão global. Boletim do Trabalho e Emprego, nº21, 8/6/2010.

## **Apêndices**



# Apêndice 1

## Protocolo Experimental

O presente protocolo inclui o procedimento seguido para a preparação do complexo MBs-PrG-mAb1 e para a realização do ensaio mpEIA “sandwich”.

### Materiais e Reagentes

- Microplacas padrão de 96 poços de fundo plano
- Tubos Eppendorf de 0,2 mL, 1,5 mL e 2,0 mL
- Micropipetas e respectivas pontas
- Separador magnético para tubos Eppendorf
- Separador magnético para microplacas de 96 poços
  
- Agitador mecânico
- Espectrofotômetro de microplacas
  
- Anticorpo primário (mAb1), 1 mg/mL
- Anticorpo secundário marcado com a enzima HRP (Ab2-HRP), 1,5 mg/mL
- Partículas magnéticas funcionalizadas com proteína G (MBs-PrG), 30 mg/mL, capacidade de captura 8 µg de anticorpo/mg de MBs-PrG (“Dynabeads® Protein G”)
- Tampão fosfato (PBS 0,1 M pH 7,4)
- Solução de BSA a 4% (m/v) em PBS 0,1 M pH 7,4
- 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB)
- Tampão não-proteico de bloqueio (“Pierce® Protein-Free”)
- Solução de ácido Sulfúrico 0,5 M
- Água ultrapura (tipo I)
  
- Amostras biológicas

## **Preparação do complexo MBs-PrG-mAb1**

- 1 – Ressuspender as partículas magnéticas (MBs-PrG) no frasco comercial (vortex >30s ou agitação manual durante 5 min);
- 2 – Transferir 50 µL (1,5 mg) de partículas magnéticas para um tubo eppendorf de 1,5 mL;
- 3 – Colocar o tubo eppendorf no magneto e deixar as MBs separarem-se da solução;
- 4 – Remover o sobrenadante;
- 5 – Adicionar 500 µL de PBS 0,1 M pH 7,4 e agitar durante 1 min;
- 6 – Colocar novamente o tubo eppendorf no magneto e deixar as MBs separarem-se da solução;
- 7 – Remover o sobrenadante;
- 8 – Repetir a lavagem 3x com 500 µL de PBS 0,1 M pH 7,4 removendo sempre o sobrenadante;
- 9 – Adicionar a quantidade desejada de mAb1 (para 1,5 mg de partículas magnéticas com uma capacidade de captura de 8 µg de anticorpo/mg de MBs-PrG, são necessários 12 µL de mAb1 1 mg/mL) e 200 µL de PBS 0,1 M pH 7,4;
- 10 – Incubar à temperatura ambiente durante 10 min com agitação;
- 11 – Colocar o tubo eppendorf no magneto e remover o sobrenadante;
- 12 – Repetir a lavagem 3x com 200 µL de PBS 0,1 M pH 7,4 removendo sempre o sobrenadante;
- 13 – Ressuspender em 1000 µL de PBS 0,1 M pH 7,4 e armazenar a suspensão a 4 °C até à sua utilização (Solução-Mãe).

Para o ensaio mpEIA usam-se 25 µL de **MBs-mAb1** (contendo 5 µg de MBs). Para isso temos que fazer a seguinte diluição (preparar 1 mL):

133,3 µL da Solução-Mãe + 866,7 µL PBS 0,1 M pH 7,4 ⇒ **MBs-PrG-mAb1 Diluído com uma concentração de 200 µg MBs-PrG-mAb1/mL**

## Ensaio mpEIA “sandwich”

1 – Bloquear os poços da microplaca com “Protein-Free”:

- Cobrir totalmente os poços da placa com solução “Protein-Free” (300-400  $\mu$ L);
- Incubar durante a noite à temperatura ambiente;
- Esvaziar os poços;

2 – Adicionar 25  $\mu$ L do complexo **MBs-PrG-mAb1 Diluído** (contendo 5  $\mu$ g de MBs) a cada poço;

3 – Adicionar 100  $\mu$ L de BSA a 4% (para bloquear os locais excedentes da superfície das partículas magnéticas);

4 – Incubar 60 min à temperatura ambiente;

5 – Adicionar 25  $\mu$ L de amostra;

6 – Incubar 60 min à temperatura ambiente com agitação suave;

7 – Colocar a placa no separador magnético e eliminar o sobrenadante de cada um dos poços;

8 – Lavar 3x com PSB 0,1 M pH 7,4:

- Adicionar 300  $\mu$ L de PSB a cada poço;
- Agitar durante 1 min;
- Colocar a placa no magneto e remover o sobrenadante;
- Repetir a lavagem mais duas vezes;

9 – Adicionar 25  $\mu$ L de Ab2-HRP 1  $\mu$ g/mL e deixar incubar 60 min à temperatura ambiente com agitação suave;

10 – Colocar a placa no magneto e eliminar o sobrenadante;

11 - Lavar 3x com PSB 0,1 M pH 7,4:

- Adicionar 300  $\mu$ L de PSB a cada poço;
- Agitar durante 1 min;
- Colocar a placa no magneto e remover o sobrenadante;
- Repetir a lavagem mais duas vezes;

12 – Adicionar 25  $\mu$ L de solução TMB e 25  $\mu$ L de PBS 0,1 M pH 7,4;

- 13 – Incubar 10 min à temperatura ambiente com agitação suave;
- 14 – Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,5M a cada poço;
- 15 – Transferir o sobrenadante para outro poço para o separar das esferas;
- 16 – Fazer a leitura espectrofotométrica da microplaca a 450 nm com filtro 415 nm.

**Nota:** Os anticorpos primário e secundário foram aliquotados, aquando da sua receção, em alíquotas de 12  $\mu\text{L}$  e 10  $\mu\text{L}$ , respetivamente, utilizando tubos eppendorf de 0,2 mL, e conservados/armazenados de acordo com as instruções do fabricante, até à sua utilização.

## Apêndice 2

### Resultados de sensibilidade e especificidade para valores de “cut-off” no intervalo entre 0,050 e 0,450 nm

**Tabela 1** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,050 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas		S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	100% (12/12)	42,9% (18/42)
7	0,323	8	0,021		
10	0,249	9	0,042		
13	0,490	11	0,009		
16	0,630	12	0,021		
19	0,523	21	0,004		
26	0,236	22	0,030		
27	0,471	23	0,049		
28	0,647	24	0,034		
29	0,285	34	0,048		
30	0,434	36	0,049		
54	1,250	38	0,025		
		43	0,033		
		45	0,036		
		46	0,020		
		48	0,023		
		52	0,048		
		53	0,047		
Total = 12 Amostras		Total = 18 Amostras			

**Tabela 2** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,075 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas		S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	100% (12/12)	69,1% (29/42)
7	0,323	5	0,063		
10	0,249	6	0,056		
13	0,490	8	0,021		
16	0,630	9	0,042		
19	0,523	11	0,009		
26	0,236	12	0,021		
27	0,471	20	0,055		
28	0,647	21	0,004		
29	0,285	22	0,030		
30	0,434	23	0,049		
54	1,250	24	0,034		
		25	0,053		
		34	0,048		
		36	0,049		
		37	0,068		
		38	0,025		
		40	0,057		
		41	0,053		
		42	0,068		
		43	0,033		
		44	0,053		
		45	0,036		
		46	0,020		
		48	0,023		
		49	0,064		
Total = 12 Amostras		Total = 29 Amostras			

**Tabela 3** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,100 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas		S (%)	E (%)		
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)				
4	0,497	1	0,034	100% (12/12)	83,3% (35/42)		
7	0,323	5	0,063				
10	0,249	6	0,056				
13	0,490	8	0,021				
16	0,630	9	0,042				
19	0,523	11	0,009				
26	0,236	12	0,021				
27	0,471	17	0,088				
28	0,647	18	0,092				
29	0,285	20	0,055				
30	0,434	21	0,004				
54	1,250	22	0,030				
		23	0,049				
		24	0,034				
		25	0,053				
		32	0,087				
		33	0,098				
		34	0,048				
		36	0,049				
		37	0,068				
		38	0,025				
		39	0,078				
		40	0,057				
		41	0,053				
		42	0,068				
		43	0,033				
		44	0,053				
		45	0,036				
		46	0,020				
		48	0,023				
		49	0,064				
		50	0,065				
		51	0,077				
		52	0,048				
		53	0,047				
Total = 12 Amostras		Total = 35 Amostras					

**Tabela 4** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,125 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	34	0,048	100% (12/12)	95,2% (40/42)
7	0,323	3	0,101	35	0,110		
10	0,249	5	0,063	36	0,049		
13	0,490	6	0,056	37	0,068		
16	0,630	8	0,021	38	0,025		
19	0,523	9	0,042	39	0,078		
26	0,236	11	0,009	40	0,057		
27	0,471	12	0,021	41	0,053		
28	0,647	14	0,120	42	0,068		
29	0,285	17	0,088	43	0,033		
30	0,434	18	0,092	44	0,053		
54	1,250	20	0,055	45	0,036		
		21	0,004	46	0,020		
		22	0,030	47	0,108		
		23	0,049	48	0,023		
		24	0,034	49	0,064		
		25	0,053	50	0,065		
		31	0,121	51	0,077		
		32	0,087	52	0,048		
		33	0,098	53	0,047		
Total = 12 Amostras		Total = 40 Amostras					

**Tabela 5** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,150 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	34	0,048	100% (12/12)	95,2% (40/42)
7	0,323	3	0,101	35	0,110		
10	0,249	5	0,063	36	0,049		
13	0,490	6	0,056	37	0,068		
16	0,630	8	0,021	38	0,025		
19	0,523	9	0,042	39	0,078		
26	0,236	11	0,009	40	0,057		
27	0,471	12	0,021	41	0,053		
28	0,647	14	0,120	42	0,068		
29	0,285	17	0,088	43	0,033		
30	0,434	18	0,092	44	0,053		
54	1,250	20	0,055	45	0,036		
		21	0,004	46	0,020		
		22	0,030	47	0,108		
		23	0,049	48	0,023		
		24	0,034	49	0,064		
		25	0,053	50	0,065		
		31	0,121	51	0,077		
		32	0,087	52	0,048		
		33	0,098	53	0,047		
Total = 12 Amostras		Total = 40 Amostras					

**Tabela 6** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,175 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	34	0,048	100% (12/12)	97,6% (41/42)
7	0,323	2	0,159	35	0,110		
10	0,249	3	0,101	36	0,049		
13	0,490	5	0,063	37	0,068		
16	0,630	6	0,056	38	0,025		
19	0,523	8	0,021	39	0,078		
26	0,236	9	0,042	40	0,057		
27	0,471	11	0,009	41	0,053		
28	0,647	12	0,021	42	0,068		
29	0,285	14	0,120	43	0,033		
30	0,434	17	0,088	44	0,053		
54	1,250	18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
		33	0,098				
Total = 12 Amostras		Total = 41 Amostras					

**Tabela 7** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,200 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	100% (12/12)	100% (42/42)
7	0,323	2	0,159	34	0,048		
10	0,249	3	0,101	35	0,110		
13	0,490	5	0,063	36	0,049		
16	0,630	6	0,056	37	0,068		
19	0,523	8	0,021	38	0,025		
26	0,236	9	0,042	39	0,078		
27	0,471	11	0,009	40	0,057		
28	0,647	12	0,021	41	0,053		
29	0,285	14	0,120	42	0,068		
30	0,434	15	0,181	43	0,033		
54	1,250	17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 12 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 8** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,220 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	100% (12/12)	100% (42/42)
7	0,323	2	0,159	34	0,048		
10	0,249	3	0,101	35	0,110		
13	0,490	5	0,063	36	0,049		
16	0,630	6	0,056	37	0,068		
19	0,523	8	0,021	38	0,025		
26	0,236	9	0,042	39	0,078		
27	0,471	11	0,009	40	0,057		
28	0,647	12	0,021	41	0,053		
29	0,285	14	0,120	42	0,068		
30	0,434	15	0,181	43	0,033		
54	1,250	17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 12 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 9** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,240 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	91,7% (11/12)	100% (42/42)
7	0,323	2	0,159	34	0,048		
10	0,249	3	0,101	35	0,110		
13	0,490	5	0,063	36	0,049		
16	0,630	6	0,056	37	0,068		
19	0,523	8	0,021	38	0,025		
27	0,471	9	0,042	39	0,078		
28	0,647	11	0,009	40	0,057		
29	0,285	12	0,021	41	0,053		
30	0,434	14	0,120	42	0,068		
54	1,250	15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 11 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 10** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,260 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	83,3% (10/12)	100% (42/42)
7	0,323	2	0,159	34	0,048		
13	0,490	3	0,101	35	0,110		
16	0,630	5	0,063	36	0,049		
19	0,523	6	0,056	37	0,068		
27	0,471	8	0,021	38	0,025		
28	0,647	9	0,042	39	0,078		
29	0,285	11	0,009	40	0,057		
30	0,434	12	0,021	41	0,053		
54	1,250	14	0,120	42	0,068		
		15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 10 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 11** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,280 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	83,3% (10/12)	100% (42/42)
7	0,323	2	0,159	34	0,048		
13	0,490	3	0,101	35	0,110		
16	0,630	5	0,063	36	0,049		
19	0,523	6	0,056	37	0,068		
27	0,471	8	0,021	38	0,025		
28	0,647	9	0,042	39	0,078		
29	0,285	11	0,009	40	0,057		
30	0,434	12	0,021	41	0,053		
54	1,250	14	0,120	42	0,068		
		15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 10 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 12** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,300 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	75% (9/12)	100% (42/42)
7	0,323	2	0,159	34	0,048		
13	0,490	3	0,101	35	0,110		
16	0,630	5	0,063	36	0,049		
19	0,523	6	0,056	37	0,068		
27	0,471	8	0,021	38	0,025		
28	0,647	9	0,042	39	0,078		
30	0,434	11	0,009	40	0,057		
54	1,250	12	0,021	41	0,053		
		14	0,120	42	0,068		
		15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 9 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 13** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,350 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	66,7% (8/12)	100% (42/42)
13	0,490	2	0,159	34	0,048		
16	0,630	3	0,101	35	0,110		
19	0,523	5	0,063	36	0,049		
27	0,471	6	0,056	37	0,068		
28	0,647	8	0,021	38	0,025		
30	0,434	9	0,042	39	0,078		
54	1,250	11	0,009	40	0,057		
		12	0,021	41	0,053		
		14	0,120	42	0,068		
		15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 8 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 14** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,400 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	66,7% (8/12)	100% (42/42)
13	0,490	2	0,159	34	0,048		
16	0,630	3	0,101	35	0,110		
19	0,523	5	0,063	36	0,049		
27	0,471	6	0,056	37	0,068		
28	0,647	8	0,021	38	0,025		
30	0,434	9	0,042	39	0,078		
54	1,250	11	0,009	40	0,057		
		12	0,021	41	0,053		
		14	0,120	42	0,068		
		15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
32	0,087	53	0,047				
Total = 8 Amostras		Total = 42 Amostras					

**Tabela 15** Sensibilidade e especificidade para um valor de “cut-off” teórico definido a 0,450 nm

Verdadeiras Positivas		Verdadeiras Negativas				S (%)	E (%)
Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)	Amostra	Absorvância (nm)		
4	0,497	1	0,034	33	0,098	58,3% (7/12)	100% (42/42)
13	0,490	2	0,159	34	0,048		
16	0,630	3	0,101	35	0,110		
19	0,523	5	0,063	36	0,049		
27	0,471	6	0,056	37	0,068		
28	0,647	8	0,021	38	0,025		
54	1,250	9	0,042	39	0,078		
		11	0,009	40	0,057		
		12	0,021	41	0,053		
		14	0,120	42	0,068		
		15	0,181	43	0,033		
		17	0,088	44	0,053		
		18	0,092	45	0,036		
		20	0,055	46	0,020		
		21	0,004	47	0,108		
		22	0,030	48	0,023		
		23	0,049	49	0,064		
		24	0,034	50	0,065		
		25	0,053	51	0,077		
		31	0,121	52	0,048		
		32	0,087	53	0,047		
Total = 7 Amostras		Total = 42 Amostras					



## **Anexos**



# Anexo 1

## Comissão de Ética da Universidade da Beira Interior

### Parecer de conclusão – Processo n.º CE-UBI-Pj-2019-029\_ID1258



comissaodeetica@ubi.pt  
Convento de Santo António  
6201-001 Covilhã | Portugal

### Parecer relativo ao processo n.º CE-UBI-Pj-2019-029:ID1258

Na sua reunião de 9 de julho de 2019 a Comissão de Ética apreciou a documentação científica submetida referente ao pedido de parecer do projeto “**Validação de um imunossensor para diagnóstico de infecção por citomegalovírus humano**”, da proponente **Paula Cristina Barbosa de Sousa Soares**, a que atribuiu o código n.º CE-UBI-Pj-2019-029.

Na sua análise não identificou matéria que ofenda os princípios éticos e morais sendo de parecer que o estudo em causa pode ser aprovado.

Covilhã e UBI, 16 de julho de 2019

O Presidente da Comissão de Ética



Professor Doutor José António Martinez Souto de Oliveira  
Professor Emérito



## Anexo 2

### Registo de Presenças



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Faculdade de Ciências da Saúde

ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA – REGISTO DE PRESENÇAS

Farmácia Farmácia São João - Covilhã

Aluno Paula Sousa Soares

Supervisor/Tutor D.ª Dina Esteves

Período do Estágio FEV. 2014 - FEV. 2015

Data	Nº horas	Supervisor	Data	Nº horas	Supervisor
1.2.2014	4		28.2.2014	3	E
5.2.2014	2		1.3.2014	4	E
6.2.2014	2		10.3.2014	3	E
7.2.2014	2		11.3.2014	3	E
8.2.2014	4		12.3.2014	3	E
10.2.2014	2		13.3.2014	3	E
11.2.2014	3		14.3.2014	3	E
12.2.2014	3		15.3.2014	4	E
13.2.2014	3		17.3.2014	2	E
14.2.2014	3		18.3.2014	2	E
15.2.2014	4		19.3.2014	2	E
17.2.2014	2		20.3.2014	2	E
18.2.2014	2		21.3.2014	2	E
19.2.2014	2		24.3.2014	3	E
20.2.2014	2		25.3.2014	3	E
21.2.2014	2		26.3.2014	3	E
22.2.2014	4		27.3.2014	3	E
24.2.2014	3		28.3.2014	3	E
25.2.2014	3		29.3.2014	4	E
26.2.2014	3		1.4.2014	2	E
27.2.2014	3		2.4.2014	2	E

Data	Nº horas	Supervisor	Data	Nº horas	Supervisor
3.4.2014	2		9.5.2014	2	E
4.4.2014	2		10.5.2014	4	E
5.4.2014	4		12.5.2014	2	E
7.4.2014	2		13.5.2014	2	E
8.4.2014	2		14.5.2014	2	E
9.4.2014	2		15.5.2014	2	E
10.4.2014	2		16.5.2014	2	E
11.4.2014	2		17.5.2014	4	E
14.4.2014	9		19.5.2014	3	E
15.4.2014	5		20.5.2014	3	E
16.4.2014	9		21.5.2014	3	E
17.4.2014	9		22.5.2014	3	E
19.4.2014	4		23.5.2014	3	E
22.4.2014	3		24.5.2014	3	E
29.4.2014	3		26.5.2014	2	E
30.4.2014	3		27.5.2014	2	E
2.5.2014	3		28.5.2014	2	E
5.5.2014	2		29.5.2014	2	E
6.5.2014	2		30.5.2014	2	E
7.5.2014	2		31.5.2014	4	E
8.5.2014	2		2.6.2014	3	E

Data	Nº horas	Supervisor	Data	Nº horas	Supervisor
3.6.2014	3		17.7.2014	3	E
4.6.2014	3		18.7.2014	3	E
5.6.2014	3		19.7.2014	4	E
6.6.2014	3		21.7.2014	3	E
7.6.2014	4		22.7.2014	3	E
9.6.2014	3		23.7.2014	3	E
11.6.2014	2		24.7.2014	3	E
12.6.2014	2		25.7.2014	3	E
13.6.2014	2		26.7.2014	4	E
16.6.2014	3		28.7.2014	2	E
17.6.2014	3		29.7.2014	2	E
18.6.2014	2		30.7.2014	2	E
20.6.2014	3		31.7.2014	2	E
23.6.2014	9		1.8.2014	2	E
25.6.2014	9		18.8.2014	10	E
26.6.2014	9		19.8.2014	10	E
27.6.2014	9		20.8.2014	10	E
28.6.2014	4		21.8.2014	10	E
14.7.2014	3		22.8.2014	10	E
15.7.2014	3		23.8.2014	4	E
16.7.2014	3		25.8.2014	10	E

Data	Nº horas	Supervisor	Data	Nº horas	Supervisor
26.8.2014	10		10.10.2014	3	P
27.8.2014	10		13.10.2014	2	P
28.8.2014	10		14.10.2014	2	P
29.8.2014	10		15.10.2014	2	P
30.8.2014	4		16.10.2014	2	P
15.9.2014	2		17.10.2014	2	P
16.9.2014	2		18.10.2014	4	P
17.9.2014	2		21.10.2014	10	P
18.9.2014	2		22.10.2014	10	P
19.9.2014	2		23.10.2014	10	P
20.9.2014	4		24.10.2014	10	P
22.9.2014	3		25.10.2014	4	P
23.9.2014	3		27.10.2014	2	P
24.9.2014	3		28.10.2014	2	P
25.9.2014	3		29.10.2014	2	P
26.9.2014	3		30.10.2014	2	P
27.9.2014	4		31.10.2014	2	P
6.10.2014	3		3.11.2014	3	P
7.10.2014	3		4.11.2014	3	P
8.10.2014	3		5.11.2014	3	P
9.10.2014	3		6.11.2014	3	P

Data	Nº horas	Supervisor	Data	Nº horas	Supervisor
7.11.2014	3		6.12.2014	4	P
10.11.2014	3		9.12.2014	3	P
11.11.2014	3		10.12.2014	3	P
12.11.2014	3		11.12.2014	3	P
13.11.2014	3		12.12.2014	3	P
14.11.2014	3		13.12.2014	4	P
17.11.2014	2		15.12.2014	2	P
18.11.2014	2		16.12.2014	2	P
19.11.2014	2		17.12.2014	2	P
20.11.2014	2		18.12.2014	2	P
21.11.2014	2		19.12.2014	2	P
22.11.2014	4		22.12.2014	10	P
24.11.2014	2		23.12.2014	10	P
25.11.2014	2		12.1.2015	2	P
26.11.2014	2		13.1.2015	2	P
27.11.2014	2		14.1.2015	2	P
28.11.2014	2		15.1.2015	2	P
2.12.2014	3		16.1.2015	3	P
3.12.2014	3		17.1.2015	4	P
4.12.2014	3		19.1.2015	3	P
5.12.2014	3		20.1.2015	3	P



## Anexo 3

### Requisitos de envio obrigatório ao INFARMED (Estupefacientes e Psicotrópicos)

Sintetizam-se, no quadro seguinte, os requisitos actualizados de envio obrigatório ao INFARMED:

REQUISITOS DE ENVIO OBRIGATÓRIO AO INFARMED				
ESTUPEFACIENTES E PSICOTRÓPICOS	REGISTO DE ENTRADAS	REGISTO DE SAÍDAS*	MAPA DE BALANÇO	CÓPIA DE RECEITAS
TABELAS I, II-B, II-C	Trimestralmente Até 15 dias após o termo de cada trimestre	Mensalmente Até ao dia 8 do 2.º mês seguinte	Anualmente Até dia 31 de Janeiro do ano seguinte	Mensalmente SÓ RECEITA MANUAL Até ao dia 8 do mês seguinte
TABELAS III E IV (incluem as benzodiazepinas)	Anualmente Até dia 31 de Janeiro do ano seguinte	Não se aplica	Anualmente Até dia 31 de Janeiro do ano seguinte	Não se aplica
<b>MANTER ARQUIVO DE TODOS OS DOCUMENTOS DURANTE 3 ANOS</b>				



## Anexo 4

### Tabela de valores de referência de alguns parâmetros bioquímicos, disponível na Farmácia São João



#### Glicemia jejum

Concentração de glucose (mg/dl)	Situação
126	Elevado
110 a 125	Alto
70 a 109	Normal
« 70	Baixo

Adaptado da classificação da DGS, 2002

#### Glicemia Pós-pandrial

Concentração de glucose (mg/dl)	Situação
140	Elevado
« 140	Normal

Adaptado da classificação da DGS, 2002

#### Colesterol

Parâmetros	Valores de referência (mg/dl)
Colesterol total	« 190
Colesterol HDL	Homens » 40 Mulheres » 46
Colesterol LDL	« 115
Triglicerídeos	« 150

Classificação da European Guidelines on Cardiovascular Disease

Sua Marques de Avila e Botana n.º 347  
6200 - 855 Covilhã  
tel: 275221609 fax: 275211768

