

Hugo Miguel Pires Fonseca

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas de grafeno-ouro e suas aplicações no tratamento e diagnóstico do cancro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Ana Leite e Silva, da Dra. Sandra Almeida e do Professor Doutor João Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Hugo Miguel Pires Fonseca

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas de grafeno-ouro e suas aplicações no tratamento e diagnóstico do cancro” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, respetivamente, da Dra. Ana Leite e Silva, da Dra. Sandra Almeida e do Professor Doutor João Leitão e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Hugo Miguel Pires Fonseca, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2012137857, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas de grafeno-ouro e suas aplicações no tratamento e diagnóstico do cancro” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 14 de setembro de 2017.



(Hugo Miguel Pires Fonseca)

Agradecimentos

Quero agradecer aos meus pais pelo apoio incondicional que sempre recebi ao longo destes cinco anos.

Aos colaboradores e orientadores da Bluepharma Indústria Farmacêutica SA, à equipa das Estabilidades que me acolheu de braços abertos, em especial ao João, à Joana e à Vanessa pelo companheirismo.

A toda a equipa da Farmácia Coimbra pela paciência e por todo o conhecimento que me transmitiram; À Dra. Ana Leite e Silva, à Catarina, à Judite, à Diana, às Ritas e a todas as colegas que me acompanharam nessa jornada.

Um especial abraço de agradecimento a todos os meus amigos e amigas com os quais partilhei momentos inesquecíveis mesmo quando as vicissitudes pareciam intransponíveis.

Um agradecimento ao meu orientador interno, o Professor Doutor João Leitão por me ter guiado durante a elaboração da monografia.

Um sincero obrigado a todos os que fizeram parte do meu percurso académico.

Lista de abreviaturas

CEA: *Carcino-embryonic antigen* (antigénio carcino-embriónico)

DNR: Daunorrubicina

DOX: Doxorubicina

FC: Farmácia Coimbra

GF: Grafeno

GO: Grafeno oxidado

gp-P: Anticorpos monoclonais para a glicoproteína-P

GSH: Glutatião

KA: Linhas celulares leucémicas multirresistentes

LbL: *Layer-by-Layer* (camada-a-camada)

MICF: Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM: Medicamentos não sujeitos a receita médica

MSRM: Medicamentos sujeitos a receita médica

NPs: Nanopartículas

OOS: *Out-of-specification* (fora de especificação)

OOT: *Out-of-trend* (fora de tendência)

PEG: Polietilenoglicol

rGO: *Reduced graphene oxide* (óxido de grafeno reduzido)

SERS: *Surface Enhanced Raman Scattering* (dispersão de Raman amplificada por superfície)

SOP: *Standard Operating Procedure* (Procedimento Operacional Normalizado)

ssDNA: *Single Strand DNA*

SWOT: *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats* (Pontos fortes, Pontos fracos, Oportunidades, Ameaças)

Resumo dos relatórios dos estágios

Findo 5 anos na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra na qualidade de estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, chegou a altura de proceder à última fase desta jornada, o Estágio Curricular. Tendo a oportunidade, estagiei durante três meses na Bluepharma Indústria Farmacêutica SA, participando num projeto na área da Documentação nas Estabilidades, seguido de 810 horas de estágio na Farmácia Coimbra, onde tive a oportunidade de colaborar como farmacêutico de oficina. O presente documento explorará as minhas funções enquanto estagiário bem como apresentará uma análise SWOT do meu desempenho em cada uma das áreas.

Internships' report – abstract

The five years as a student of Pharmaceutical Sciences at the University of Coimbra have come to their inevitable end. Thus, the time for the last leap towards the end of this journey is upon me – the Curricular Internship. Being given the opportunity, I had the privilege of serving as an intern for three months at Bluepharma Indústria Farmacêutica SA, a pharmaceutical industry, where I participated in a project regarding stability studies. After that, I did an 810 hour internship at Farmácia Coimbra where I took up work as pharmacist. The following document describes my duties as an intern and includes a SWOT analysis of my performance in both internships.

Resumo

A detecção e tratamento precoce do cancro continua a ser um dos grandes desafios do século XXI. Segundo a WHO, em 2015, 1 em cada 6 mortes estiveram diretamente relacionadas com o cancro (dados de fevereiro de 2017) e o número continua a aumentar. As terapêuticas convencionais poderão ter chegado ao seu limite, e o mundo vira-se agora para terapias alternativas como a baseada na nanotecnologia como resposta a este enorme flagelo. Os nanocompósitos de grafeno com ouro têm-se destacado pela positiva no diagnóstico, na terapêutica e no teranóstico do câncer. As suas propriedades óticas, fototermiais e como veículo de fármacos fazem destes nanocompósitos alternativas potenciais na luta contra o cancro. Nesta monografia irá focar-se em detalhe na síntese destas nanopartículas, destacando as suas principais qualidades e descrevendo alguns exemplos das suas aplicações no tratamento e diagnóstico do câncer.

Palavras-chave: Nanopartículas; Grafeno-Ouro; Tratamento do Cancro; Diagnóstico do Cancro; Teranóstico

Abstract

Early detection and treatment of cancer remains one of the biggest challenges plaguing the 21st century. According to WHO, in 2015, 1 in every 6 deaths were directly associated with cancer and the number keeps rising (data from February 2017). Conventional therapies may have reached their limit, and the world now turns to nanotechnology based alternatives as a response to this devastating calamity. Graphene-gold nanocomposites have been on the sights of scientists worldwide for their results in the diagnosis, therapy and theranostics of cancer. Their proven optical, photothermal and drug loading properties make these constructs serious competitors in the fight against cancer. Herein, the synthesis and qualities of these nanoparticles are reported and some of their applications in cancer are brought to light.

Keywords: Nanoparticles; Graphene-Gold; Cancer Treatment; Cancer Diagnosis; Theranostics

Índice

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia de Oficina

1.Introdução	9
2.Descrição do estágio.....	9
2.1.Primeiras impressões.....	9
2.2.Início de funções – Introdução ao <i>backoffice</i>	10
2.3.Armazenamento e gestão do espaço.....	11
2.4.Gestão de reservas.....	11
2.5.O <i>frontoffice</i>	12
3.Análise SWOT	13
3.1.Pontos Fortes.....	13
3.2.Pontos Fracos	14
3.3.Oportunidades.....	14
3.4.Ameaças	15
4.Caso Prático	15
4.1.Exemplo.....	16
5.Considerações Finais.....	16

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

1.Introdução	18
2.A Bluepharma.....	18
3.Descrição do estágio.....	18
3.1.Início de estágio	18
3.2.Foco do estágio	19
4.Análise SWOT	21
4.1.Pontos Fortes.....	21
4.2.Pontos Fracos	22
4.3.Oportunidades.....	22
4.4.Ameaças	22
5.Considerações	23

Parte III

Nanopartículas de grafeno-ouro e suas aplicações no tratamento e diagnóstico do cancro

1.Introdução	25
1.1.Utilização das nanopartículas em biomedicina.....	25

1.2.Veículo de fármacos para células tumorais.....	25
1.2.1. <i>Drug delivery</i> passivo.....	26
1.2.2. <i>Drug delivery</i> ativo.....	27
1.3.Vantagens das NPs em relação às abordagens oncológicas convencionais .	27
2.Nanopartículas de grafeno	28
2.1.Vantagens de nanocompósitos à base de GF no câncer	29
3.Métodos de síntese de nanocompósitos de GF-Au.....	30
3.1.Síntese do GF.....	30
3.2.Síntese de nanocompósitos GF-Au	31
3.2.1.Métodos <i>in-situ</i>	31
3.2.2.Métodos <i>ex-situ</i>	33
4.Comparação dos nanocompósitos GF-Au com outras NPs.....	33
5.Bioimagem no câncer.....	34
5.1.Exemplos.....	35
6. <i>Drug delivery</i> no câncer.....	36
6.1.Exemplos.....	37
7.Aplicações teranósticas.....	39
8.Outras potenciais aplicações terapêuticas	39
9.Toxicidade e biocompatibilidade das espécies derivadas do GF.....	40
10.Conclusões.....	42
Bibliografia	43

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia de Oficina

I. Introdução

A Farmácia Coimbra, doravante denominada FC, é uma farmácia que, embora com poucos anos de história, tem como fundamentos basilares o profissionalismo, o empenho e a diligência. A FC, estando no seio de um centro comercial, o Coimbra Shopping, tem, naturalmente, um grande volume de utentes, não só habituais, mas passageiros e turistas que fazem desta uma farmácia que necessite de constante adaptação, atualização de conhecimentos e, como vim a descobrir, fluência em várias línguas.

A FC trabalha com um vasto leque de marcas, não só de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) mas também de produtos de dermocosmética, bens puerperais e medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), o que me permitiu ter um contacto muito abrangente com um sem número de princípios ativos, galénicas e produtos medicamentosos que me eram até então desconhecidos.

Concluo esta breve introdução com uma nota de agradecimento a todos os colaboradores da FC que sempre foram para lá do que lhes era exigido para me ensinarem e me integrarem nesta nova realidade que é a farmácia de oficina.

2. Descrição do estágio

2.1. Primeiras impressões

Dei início ao meu estágio na FC a 17 de abril de 2017. O espaço de atendimento é amplo, com lineares a cobrir toda a extensão da lateral esquerda e direita. O *layout* é simples, com pouca poluição visual e nunca obstrui a visão do utente para o balcão de atendimento que se encontra disposto em L ao fundo e de frente para a entrada.

Os produtos de dermocosmética e cuidados puerperais estão dispostos por marcas em cada linear e por linhas de produto em cada prateleira, o que dá a toda a farmácia uma limpa comunhão de cores que facilita a procura das referências tanto pelo farmacêutico como pelo utente. Os balcões de atendimento são convidativos e discretos o suficiente para manter o contacto farmacêutico-utente confidencial e pessoal.

A farmácia dispõe, também, como manda a lei, de uma sala de atendimento, um laboratório de preparação de manipulados e um *backoffice* organizado que alimenta um robô de dispensa de medicamentos que é quintessencial para um atendimento eficiente dado o volume de utentes.

2.2. Início de funções – Introdução ao *backoffice*

Antes de se iniciar o atendimento, é fulcral perceber-se como funcionam as entranhas de uma farmácia. O *backoffice* e o *frontoffice* existem numa co-dependência simbiótica que possibilita um funcionamento eficaz e eficiente.

As primeiras semanas de estágio focaram-se em todo este trabalho silente e fundamental.

Entrada de encomendas: Para manter um bom abastecimento na farmácia é necessária uma entrega diária de produtos, garantido por armazenistas em grosso (Alliance, Empifarma, OCP,...), diretamente dos produtores (e.g. Bayer) ou mesmo de outras farmácias do grupo. As entregas podem ser de um pequeno volume de produtos, caso sejam relativos a reservas pedidas por utentes ou reposição de referências que estejam anormalmente em falta e precisem de ser repostas.

Quando é necessário repor uma grande quantidade de referências recorrem-se às entregas diárias; estas entregas, supervisionadas pela diretora-técnica e por ela pedidas, são feitas com base numa análise *a priori* do escoamento dos produtos bem como de uma previsão sazonal de vendas que culmina na definição de um *stock* mínimo e máximo para cada referência; Se o *stock* de determinado produto cai abaixo do *stock* mínimo, surge um alerta no pedido diário que avisa quanto à necessidade de reposição de *stock*. Consegue-se, assim, um *status quo* racional dos produtos.

A entrada de produtos propriamente dita é feita através da plataforma SIFARMA2000[®]. Quando é feito um pedido de encomenda é-lhe automaticamente atribuído um código interno; quando a encomenda chega é necessário verificar se todos os produtos chegaram e se o fizeram em conformidade (dentro da validade, embalagem em boas condições). É um processo moroso para se fazer manualmente quando se tratam de grandes encomendas. Surge aqui a primeira grande vantagem do robô: entrada de mercadorias.

Na entrada de mercadorias, o SIFARMA2000[®] comunica diretamente em rede com o robô; diz-lhe exatamente que referências estão na encomenda e a quantidade de cada uma.

Ao scanear o produto no robô e inserindo o seu prazo de validade, ele começa um intrincado processo de armazenamento racional desenhado para escoar primeiro os produtos de validade mais curta e aproveitando ao máximo todo o espaço de prateleira disponível.

Nota: claro está que nem todos os produtos estão destinados a ir para o robô (e.g. produtos de dimensões anormais, produtos de dermocosmética ou de uso veterinário, etc.) sendo que esses terão de ser manualmente introduzidos com o respetivo prazo de validade.

Depois de todos os produtos terem sido inseridos no robô, este comunica com o SIFARMA2000[®] e avisa exatamente quantos medicamentos entraram de cada referência para que se possa verificar a encomenda.

Isto é feito comparando a mercadoria que chegou com a mercadoria que foi faturada. Se estiverem os dois em sintonia, poder-se-á fechar a encomenda; caso contrário, é necessário verificar quantidades, PVF ou eventuais bónus que possam causar discrepâncias entre os valores a pagar como visto no SIFARMA2000[®] e o que vem faturado.

Findo isto, passa-se a outra função do *backoffice*:

2.3. Armazenamento e gestão do espaço

Para que o atendimento ao cliente seja o melhor possível é necessário que os produtos estejam armazenados de forma racional e intuitiva. Como tal, todas as gavetas, gôndolas e lineares atribuídos a MNSRM e outros produtos de higiene de venda livre estão organizados pela função a que se destinam, por exemplo: produtos de higiene bucal e de tratamento de suas afeções estão armazenados no mesmo módulo de gavetas sendo que cada gaveta está dividida em funções mais específicas (tratamento de aftas, tratamento de herpes, produtos de limpeza e ortodôntica,...) para que o farmacêutico não perca tempo desnecessário à procura de qualquer produto.

2.4. Gestão de reservas

Quando um utente necessita de algum produto em quantidade superior àquele disponível em *stock* ou quando quer garantir que a farmácia tem o produto que pretende, são efetuadas reservas.

O sistema de reservas utilizado pela FC assenta no sistema disponibilizado pelo SIFARMA2000[®] e começa no *frontoffice*. O farmacêutico/técnico cria a reserva de um produto e associa à ficha do utente em questão na qual que consta, pelo menos, o seu nome

e contacto. Utilizando o sistema de encomendas instantâneas, ou ligando por telefone aos armazenistas, mandam-se vir as quantidades pretendidas e assume-se no SIFARMA2000® a encomenda como “Encomendado”; e o utente recebe um talão de reserva para vir levantar o produto. No *backoffice*, aquando da entrada de produtos, surge um aviso no *software* em como determinado produto tem reserva associada; altera-se o estado de encomenda para “Recebido”, dá-se entrada do artigo e tira-se um talão de reserva para se associar a este. Posteriormente, os utentes são avisados via SMS/chamada de que a sua reserva já chegou.

O armazenamento destes itens é feito de forma ordenada e sistematizada. Há um módulo de gavetas dedicado a reservas que está dividido a meio em Pago ou Não Pago (dependendo se o utente deixou, ou não, paga a encomenda); dentro de cada um há uma disposição alfabética pelo nome do utente associado à reserva. Com este método, garante-se um atendimento ainda mais célere, uma vez que o talão de reserva que o utente guardou nos remete quase imediatamente para o local onde os produtos estão guardados, aumentando, assim, a produtividade.

Toda a metodologia por detrás da organização do *backoffice* é sistemática e coerente. Em pouco tempo me consegui adaptar ao seu funcionamento e deu-me uma nova perspetiva sobre o *modus operandi* da FC e de outras farmácias similares. Aprendi a valorizar todo o trabalho que se realiza por detrás das cortinas de uma farmácia e foi absolutamente essencial para a segunda etapa do meu estágio.

2.5.O *frontoffice*

Depois de me familiarizar com o funcionamento da farmácia e da disposição dos produtos, chegou a altura de me aproximar do atendimento ao utente. Numa fase inicial estive a acompanhar colegas farmacêuticas enquanto faziam atendimentos e aconselhavam doentes. É de notar o profissionalismo que me foi incutido durante estas semanas bem como a forma de me apresentar, conversar e ouvir os utentes para que o aconselhamento farmacêutico seja o melhor possível.

Aproveitei este tempo para me acostumar ao *software* SIFARMA2000®, aos regimes de participação existentes, aclimar-me aos atalhos que o sistema possibilita e conhecer as receitas quer eletrónicas quer manuais.

Assim que me achei e me acharam capaz, comecei, embora com ajuda, a atender utentes. Aqui incidu a maioria do tempo que tive no período de estágio, onde pude aliar todas as competências que adquiri no decorrer do curso do MICF ao *know-how* dado pelas colegas farmacêuticas para proporcionar uma experiência enriquecedora na qualidade de farmacêutico.

3. Análise SWOT

Com o decorrer das 810h de estágio tornaram-se aparentes algumas das qualidades que pude trazer ao trabalho, dificuldades que me esforcei para colmatar bem como oportunidades e ameaças inerentes ao exercício da função de farmacêutico.

3.1. Pontos Fortes

Durante o estágio rapidamente se tornou aparente que a comunicação com o utente é capital para um bom atendimento. Assinalo como ponto forte as **soft skills** que consegui pôr em prática no aconselhamento aos utentes; saber falar com clareza e de forma adaptada para cada pessoa, como transmitir conceitos ditos técnicos de forma clara e sucinta e como promover a adesão judiciosa à terapêutica, são importantes no aconselhamento; por exemplo, na toma racional de antibióticos é necessário transmitir ao doente a importância de respeitar os horários das tomas para que se sinta motivado a fazê-lo.

Considero indispensável, também, a minha **fluência no inglês** que me permitiu estender o meu conhecimento não só à população de língua portuguesa mas também ao sem número de estrangeiros cuja língua franca é o inglês. De valorizar, também na mesma veia, o conhecimento básico de alemão que mais que uma vez me permitiu comunicar com clareza com aqueles que a falam exclusivamente.

Foi imprescindível o **conhecimento técnico** que os 5 anos de MICF me ofereceram. São de salientar os fundamentos de Farmacologia, Farmacoterapia, Farmácia Clínica, e de Organização e Gestão Farmacêutica que me permitiram aplicar a casos reais os conceitos teóricos nelas aprendidos.

É pertinente também referir o bom **relacionamento interpessoal** no ambiente de trabalho. Na FC encontrei uma equipa forte e coesa na qual me senti integrado e relevante

enquanto estagiário; permitiu ainda um bom clima para expor dúvidas e discutir casos clínicos.

3.2. Pontos Fracos

Refletindo sobre os meus pontos fracos consigo apontar certas falhas que dificultaram o meu quotidiano na farmácia.

Principalmente no início do estágio, apercebi-me que tinha limitações no **conhecimento das marcas** de princípios ativos. Comumente os doentes pedem a medicação exclusivamente pela sua denominação comercial o que se tornou uma dificuldade para mim que havia tido pouco contacto com o lado comercial do medicamento.

Outra fraqueza que reconheço que tive foi no conhecimento dos **produtos de dermocosmética**. O tempo curricular dedicado a este tema pouco nos prepara para a realidade da farmácia. O utente espera um vasto conhecimento da nossa parte dos produtos; no entanto para termos mais noções sobre o assunto ou recorreremos a colegas mais experientes que nós ou a formações enviadas das próprias marcas de cosméticos, o que compromete o nosso domínio da área.

3.3. Oportunidades

Sendo uma farmácia de grandes dimensões, a FC permitiu-me ter uma experiência completa do mundo farmacêutico.

Tive a oportunidade de **preparar manipulados**, por exemplo, um xarope de propanolol (Inderal®) para uso pediátrico que me permitiu pôr em prática alguns dos conhecimentos que adquiri nas cadeiras de Farmácia Galénica e Tecnologia Farmacêutica.

Aproveitei para **colmatar** o meu fraco **conhecimento em cosméticos** com a grande disponibilidade dos mesmos que a FC dispõe. Produtos com os quais havia tido pouco contacto tornaram-se, assim, meus conhecidos. Dou o exemplo de marcas como Filorga®, Caudalie® e A-derma® cujos produtos não conhecia.

No mesmo âmbito, tive a oportunidade de receber **formações** em alguns produtos de algumas marcas de produtos de venda livre. Deram-me a conhecer os seus componentes, utilizações e modos de aplicação. Destaco, por exemplo, uma formação sobre os produtos da Akileïne® e da Ecrinal® que me deram a conhecer mais sobre que tipo de substâncias se

adequam a uma boa manutenção das mãos, pés e unhas; ou ainda formações sobre produtos solares que, embora não me fossem desconhecidos, oferecem sempre algo de novo.

3.4.Ameaças

Nas ameaças ao farmacêutico destaco principalmente a **quantidade de desinformação** que circula nos meios de comunicação (e mesmo entre as pessoas) que leva a que o utente crie juízos errados acerca dos medicamentos e suplementos. É demasiado fácil disseminar na internet informação errónea, e encontrei casos de utentes a fazer usos *off-label* de medicamentos sem recomendação médica mas com base em pseudo-artigos que alegam legitimidade. Isto complica a função do farmacêutico; o utente torna-se, por vezes, reticente quando contrapomos aquilo que viu ou que lhe contaram, levando a situações de uso irracional de medicamentos quer sujeitos quer não a receita médica. Cabe-nos a nós dissuadir este tipo de comportamentos e espalhar informação fidedigna para o bem da saúde pública.

Considero uma ameaça, também, a **quantidade de produtos**, especialmente **suplementos alimentares**, que se encontram à venda. Fruto de um *marketing* agressivo de algumas empresas, transmite-se a imagem do suplemento como uma panaceia. Na realidade o que temos é utentes a tomar este tipo de produtos de forma desmedida e potencialmente errada. O uso concomitante de alguns suplementos e de produtos à base de plantas com medicamentos passa a ideia de inocuidade por serem, ditos, “naturais”, quando na verdade podem pôr em risco a saúde dos doentes. Cabe ao farmacêutico intervir nestas situações e promover um uso judicioso destas substâncias principalmente em doentes polimedicados.

4.Caso Prático

O aconselhamento farmacêutico é o que nos destaca dos outros profissionais de saúde; os utentes depositem em nós a confiança na nossa arte e na nossa capacidade de lhes expor clara e sucintamente a resolução para os seus problemas relativamente triviais. É a nossa oportunidade de aplicar os conhecimentos adquiridos nos 5 anos de MICF e na farmácia de oficina a casos reais.

4.1.Exemplo

Um dos vários exemplos de aconselhamento no qual tive a oportunidade de participar foi num caso de uma senhora que se desloca à farmácia com início de sintomas febris e que expressou que não poderia de todo ficar doente pois teria de apresentar uma série de palestras nas quais precisaria de estar na melhor forma. A senhora comentou, também, que tinha dificuldade em deglutir comprimidos e, como tal, preferia evitar essa via.

A minha sugestão começou com o Griponal® para fazer de 8 em 8 horas um comprimido efervescente, ou de 6 em 6 em caso de sintomas severos. O paracetamol ajudaria com as dores generalizadas e febre enquanto que o maleato de clorofenamina diminuiria os sintomas de corrimento nasal, lacrimejamento e os espirros. Aconselhei ainda a toma de manhã após o pequeno-almoço uma pastilha efervescente de Vitacé® pois o ácido ascórbico, a equinácia e o zinco fortaleceriam o sistema imunitário e ajudariam a recuperar mais rapidamente do estado gripal.

A utente mostrou-se satisfeita com as recomendações mas estava ainda preocupada com o facto de poder estar com rinorreia ou com congestão nasal durante as suas apresentações. Posto isto, propus que levasse também o Vibrocil® *spray* nasal com fenilefrina e dimetindeno mas que o usasse apenas em SOS, pois a clorofenamina presente no griponal também tem o efeito do dimetindeno como anti-histamínico (de primeira geração), o que poderia levar a uma sensação de sonolência ou tonturas se utilizado em grandes quantidades. Adverti, também para não ultrapassar os 5 dias de uso pois poderia levar a habituação.

Esclarecida e confiante no meu aconselhamento, a senhora levou os três produtos conforme sugerido e ficou do lado dela a responsabilidade de os tomar conforme as minhas recomendações.

5.Considerações Finais

Do *backoffice* ao *frontoffice*, de sombra ao atendimento, cresci mais nestes últimos meses como futuro farmacêutico que nos anos antecedentes. Foi inestimável a experiência que tive oportunidade de adquirir. Lidei com pessoas de todas as idades e contextos socioeconómicos e com outros profissionais de saúde que me ajudaram a amadurecer enquanto pessoa. Um especial agradecimento a toda a equipa da FC por todo o tempo, paciência e zelo que disponibilizaram ao estagiário.

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

I. Introdução

Passados 5 anos de mestrado integrado, a Faculdade de Farmácia possibilita a inserção dos seus alunos na realidade profissional através de estágios curriculares. Neste âmbito, foi-me possibilitado estagiar na área da Indústria Farmacêutica mais especificamente na Bluepharma Indústria Farmacêutica SA.

Aceite sob alçada da Dra. Sandra Almeida recebi extensa formação acerca da área onde fui integrado: na Documentação das Estabilidades. Durante estes 3 meses consegui desenvolver com sucesso o meu plano de estágio e ainda tive a oportunidade de explorar um pouco outras áreas da Indústria.

Neste relatório dou uma breve introdução à empresa, descrevo um pouco das minhas funções enquanto estagiário e depois faço uma análise SWOT (forças, fraquezas, oportunidades e ameaças) introspectiva do meu tempo aqui passado.

2.A Bluepharma

Fruto de um projecto iniciado em 1999, a Bluepharma Indústria Farmacêutica SA adquire as antigas instalações da farmacêutica Bayer e começa o seu curto, mas rico percurso para se estabelecer como uma das grandes entidades económicas e inovativas da região centro.

3.Descrição do estágio

3.1.Início de estágio

Iniciei o estágio dia 9 de janeiro de 2017 na empresa Bluepharma Indústria Farmacêutica SA com duração de 3 meses. Inicialmente, à semelhança de muitos outros colegas que me acompanharam, passei vários dias a estudar protocolos e normas internas de modo a estar a par do tipo e qualidade de trabalho desenvolvido na Bluepharma, com maior destaque para os estudos de estabilidade *on-going* que veio a ser o escopo do meu trabalho.

Seguiram-se muitas formações sobre *softwares* internos, regras de segurança dentro e fora do laboratório, gestão e seu planeamento, bem como formações de carácter científico e comercial sobre introdução de produtos em mercados e submissão de *dossiers*.

Posteriormente tive extensas formações mais específicas da área em que estava inserido, nomeadamente formações técnico-científicas sobre estudos de estabilidade formal e *on-going* e os assuntos regulamentares por detrás deles.

Terminada a fase inicial de formação do estágio, estava em condições de iniciar o desafio que me foi proposto na Documentação das Estabilidades.

3.2.Foco do estágio

O âmbito do meu trabalho foi: análise de tendências em estabilidades e métodos de identificação de resultados *out-of-trend* (OOT) em dados de estabilidade *on-going*. I.e. ver como é que resultados que (embora dentro da especificação) fugiam à tendência (dentro daquele lote ou quando comparados com dados históricos) tinham impacto na determinação do tempo de prateleira. E.g., Na determinação de conteúdo do lote X do medicamento Y obtivemos os resultados T0=102,0%; T3=101,8%, T6=101,5%, T12=97,0%. Embora os resultados estejam todos dentro da especificação (entre 95 e 105%) de T6 para T12 houve uma discrepância muito grande de conteúdo quando comparando com os outros intervalos de tempo. Terá sido erro de execução do método analítico? Será o valor realmente representativo do lote?

Para começar a responder a estas perguntas foram necessários vários dias de pesquisa e revisão de artigos para:

- Entender o que são resultados OOT: são resultados que estão dentro dos limites estabelecidos pelas autoridades reguladoras do medicamento mas que não encaixam tendo em conta os resultados verificados noutros pontos no tempo e/ou noutros lotes históricos daquela mesma substância. Note-se a diferença entre OOT e *out-of-specification* (OOS) que são resultados que estão fora das balizas definidas.

- Encontrar um método estatístico robusto que conseguisse identificar estes pontos: como nem a FDA nem a EMA têm *guidelines* oficiais que nos digam como identificar OOTs, foi necessário realizar uma pesquisa em alguns artigos. Cheguei a um método recomendado pela European Compliance Agency chamado *Regression Control Chart Method* que é o mais estatisticamente significativo. Este método compara os valores esperados de y para aquele

lote com o valor real, dando-nos a diferença dos dados – y residual. Se este valor correspondesse a um desvio $\geq 3\sigma$ (ou outro valor por nós definido) seria lançado um alerta, o qual teria de ser verificado como OOT.

- Escolher um *software* estatístico onde compilar os resultados e utilizar este método: o Excel, embora ubíquo, nem sempre é a melhor opção em termos de funcionalidade e ferramentas gráficas; foi necessário rever os *softwares* existentes (SAS, R, Minitab, JMP,...) e escolher o mais conveniente. A minha sugestão, tendo em conta a pesquisa, foi o JMP.

Resumindo foi necessário avaliar os métodos estatísticos existentes de determinação de OOTs, escolher o academicamente preferido, compilar os dados no *software* estatístico mais adequado para só depois se poder dizer definitivamente que estamos na presença deste tipo de resultados.

O objetivo final desta análise é lançar um alerta para que se possa responder convenientemente:

- 1) Se tivermos um só resultado aberrante no tempo é possível que este resultado tenha sido influenciado por um erro analítico – Alerta Analítico – e como tal se possa remover este ponto da análise de tendências para que o produto continue a mostrar tempos de prateleira que correspondam à realidade.
- 2) Se uma sucessão de pontos mostram um padrão atípico, sem risco de OOS gera um Alerta de Controlo de Processo que remete para a verificação do processo analítico de modo a identificar a origem deste erro para que não se repita.
- 3) Se há indicação que a tendência sugere um potencial OOS antes do tempo previsto na literatura temos um Alerta de *Compliance*, que inicia imediatamente uma resposta corretiva; Este é o tipo de erro que a análise de tendências pretende identificar e eliminar o mais rapidamente possível para que todos os produtos permaneçam complacentes.

Deixei ainda a sugestão da elaboração de um Procedimento Operacional Normalizado (SOP) que facilitasse a decisão e delegação de tarefas nesta análise, para que todo o processo tivesse uma resposta rápida e judiciosa.

O meu trabalho englobou todas as etapas deste processo, tendo culminado numa apresentação em que exponho os resultados da minha pesquisa.

Estive, também, brevemente a seguir um analista no laboratório para me expor um pouco à realidade prática das Estabilidades. Consegui, assim, situar-me no contexto dos

resultados que estava a tratar na documentação propriamente dita. Foram-me dadas poucas liberdades, uma vez que este não era o âmbito do meu estágio, mas fiquei a conhecer o quotidiano de um analista no laboratório.

4. Análise SWOT

Refletindo sobre o meu estágio na indústria farmacêutica, consigo apontar alguns momentos em que o conjunto das minhas competências me tenha ajudado ou limitado no decorrer das minhas funções.

4.1. Pontos Fortes

As **competências técnico-científicas** que adquiri no decorrer da minha licenciatura e mestrado serviram-me de base para o meu trabalho enquanto colaborador da Bluepharma. Não só consegui rapidamente associar os conceitos teóricos a uma realidade prática mas também fui capaz de transpor os conhecimentos de aulas práticas para uma larga escala num contexto industrial. Destaco, principalmente os meus conhecimentos de Tecnologia Farmacêutica, Gestão e Garantia da Qualidade e Assuntos Regulamentares do Medicamento como fulcrais para o meu bom desempenho na empresa.

Conto também como ponto forte as **boas práticas de laboratório** inculcidas pela Faculdade de Farmácia que se transpuseram para o mundo profissional. Por este motivo, no breve tempo que tive no laboratório, foi-me fácil adaptar às regras de segurança e aos protocolos analíticos que me eram apresentados.

É de notar também as chamadas **soft-skills** que desempenham um papel essencial em qualquer local de trabalho. Boas relações interpessoais, capacidade de trabalho em equipa, e diligência no trabalho mostraram-se qualidades valiosas no meio de trabalho em que me inseri, ajudando-me a aproveitar ao máximo o meu tempo passado na Bluepharma.

A minha **fluência no Inglês** foi outra ferramenta crucial para o sucesso na indústria. Muitos dos procedimentos, normas e artigos nos quais me baseei para fazer o meu trabalho estão escritos em inglês, sendo que o domínio da língua é fundamental para o sucesso de qualquer colaborador. Para além do mais, a Bluepharma contacta com dezenas de países por todo o mundo que apenas têm como língua comum o inglês, o que mais acrescenta ao valor desta competência.

4.2. Pontos Fracos

Sendo completamente novo ao mundo da indústria farmacêutica, a minha **inexperiência** revelou-se, num estado inicial, um impedimento a um progresso rápido e eficiente. Como tal, isso reflete-se numa falta de autonomia, pelo que estive dependente de orientadores durante uma parte significativa do estágio. Doravante, com a experiência adquirida, serei capaz de me lançar ao trabalho com maior prontidão.

Considero, também uma fraqueza o **pouco contacto** que havia tido previamente **com software analítico** (e.g. Excel). São ferramentas amplamente utilizadas no trabalho que realizei e o meu desconhecimento da totalidade das suas funcionalidades mostrou-se, inicialmente, uma desvantagem.

4.3. Oportunidades

Tomei partido do facto de estar a **trabalhar com ferramentas de software analítico** para expandir o meu conhecimento sobre as suas funcionalidades. Focando-me no Excel, transformei a minha fraqueza (não ter muita proficiência com este) numa oportunidade. Com o tempo, vi melhorar o meu desempenho e rapidez de uso do Excel.

Aproveitei as **formações** oferecidas pela Bluepharma para sedimentar alguns conceitos relativos à indústria. Dou principal destaque às formações sobre introdução de medicamentos no mercado e sobre os estudos de estabilidade formal e *on-going*. Foram valiosíssimos para o trabalho que desempenhei e que poderei a vir desempenhar no futuro.

4.4. Ameaças

Notei que a maioria dos colaboradores da indústria farmacêutica são de diversas áreas (química, biologia) que não as ciências farmacêuticas propriamente ditas. Isso ilustra um cenário de **competitividade** que, para além de já ser feroz dentro do curso de Ciências Farmacêuticas, ainda o é de forma multidisciplinar.

Concorremos, muitas vezes, para posições *entry-level* enquanto mestres de Farmácia contra licenciados que acabam por ser preferencialmente selecionados na indústria farmacêutica, o que ameaça o nosso futuro como profissionais.

É necessário que o farmacêutico se torne mais aliciente para o empregador que o profissional de outros cursos através de uma possibilidade de canalizar o estudo do estudante de mestrado para uma área específica das Ciências Farmacêuticas, neste caso a

Indústria. Apenas demonstrando que existe valor em contratar um farmacêutico é que podemos assegurar um futuro próspero para a nossa profissão.

Poder-se-ia, também, fomentar um contacto mais próximo entre estudantes e a indústria farmacêutica pois o que se aprende durante os 5 anos de mestrado integrado, embora seja uma boa aproximação, não se compara à realidade profissional.

5.Considerações

Culminados os 3 meses de estágio chegou a altura de refletir sobre o meu tempo passado na Bluepharma. Considero positiva a minha experiência na indústria, tendo apenas pena de não poder ter circulado por outras áreas que lhe competem, por exemplo, Assuntos Regulamentares ou Desenvolvimento de Negócio.

A Indústria Farmacêutica é um mercado aliciante e altamente competitivo no qual se espera nada menos do que a mais alta qualidade e desempenho dos seus colaboradores. O profissionalismo e uma boa ética de trabalho são capitais para o sucesso nesta área.

Em todo o caso, cumpri, como esperado, o meu plano de estágio e levo comigo boas memórias do tempo que passei na Bluepharma. Deixo um especial agradecimento aos meus colegas das Estabilidades que me integraram e me orientaram durante este tempo.

Parte III

Nanopartículas de grafeno-ouro e suas aplicações no tratamento e diagnóstico do cancro

I.Introdução

I.1.Utilização das nanopartículas em biomedicina

A nanotecnologia consiste na manipulação e utilização de partículas ou sistemas delineados pelo homem que têm pelo menos uma dimensão e com menos de 100 nm [1]. As nanopartículas (NPs) são consideradas como elementos base da nanotecnologia. O seu tamanho nanométrico faz com que tenham diferentes características dos seus materiais de grande escala originais, por exemplo, pontos de fusão, propriedades óticas, propriedades magnéticas e reatividade à sua superfície diferentes [2,3].

Algumas características das NPs que podem ser úteis e aplicáveis no contexto medicinal são:

-Devido à sua menor dimensão há uma maior área de superfície disponível, o que conseqüentemente leva a um aumento de reatividade com biomoléculas [1,3];

-Necessidade de menor quantidade de amostra biológica para apresentarem resultados pois consegue-se detecção a concentrações muito baixas de substrato. Isto é extremamente importante quando analisamos biópsias com muito pouco substrato [3];

-Oferecem ainda um manancial de vantagens, tais como uma mais rápida ação, maior sensibilidade e especificidade. Os dados e estudos já existentes apontam para um potencial das NPs como meio de diagnóstico e tratamento de diversas patologias, nomeadamente no câncer [3,4].

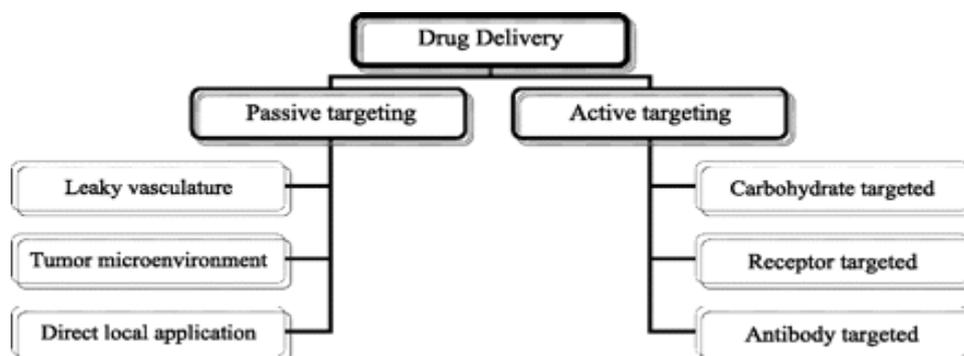
I.2.Veículo de fármacos para células tumorais

A vectorização de compostos terapêuticos para o local de ação é um problema capital no tratamento de diversas doenças nomeadamente no tratamento do câncer. A administração convencional de fármacos antineoplásicos é caracterizada pela sua eficácia limitada, fraca distribuição e falta de seletividade [5] uma vez que não diferenciam entre células tumorais e células saudáveis, o que leva a toxicidade sistémica e a efeitos secundários indesejáveis. Para além do mais, uma rápida clearance e uma difusão generalizada para órgãos e tecidos requer que o fármaco seja administrado em grandes quantidades, o que não é de todo económico e pode levar a uma toxicidade indesejada [6].

O interesse nas NPs como veículos para fármacos advém da necessidade de minimizar os efeitos citotóxicos destes nas células saudáveis, i.e. direcioná-los para os tumores e conseguir aí uma libertação controlada e circunscrita ao câncer [4,5,6].

Um fármaco pode-se ligar a um nanotransportador por meio de adsorção ou ligação covalente, ou ainda poderá ser encapsulado por este. Estes nanotransportadores poderão depois ser vetorizados para as células tumorais por mecanismos passivos ou ativos (Figura 1).

Figura 1 – Direcionamento passivo e ativo na distribuição de fármacos no cancro [6].

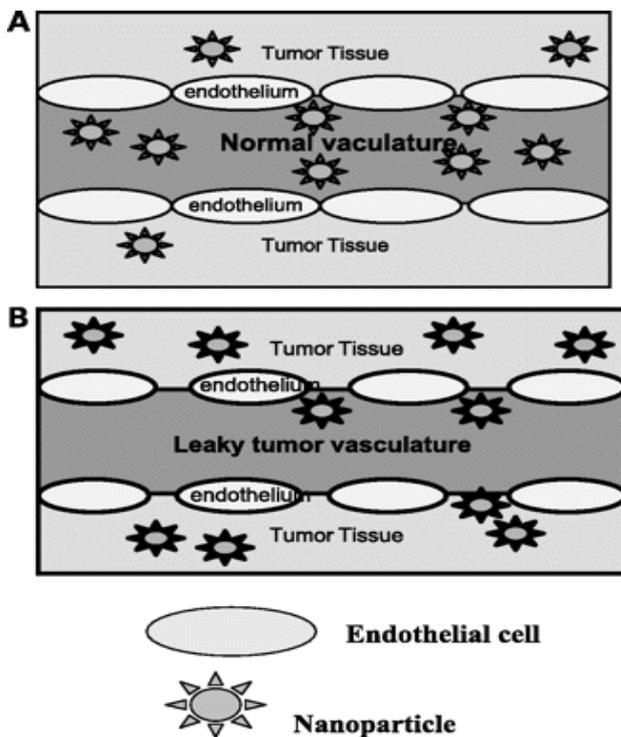


1.2.1. Drug delivery passivo

Este método utiliza a permeabilização do tecido tumoral como vantagem. A rápida vascularização que alimenta um tumor em crescimento tende a ser **vazante** e defeituosa, isto é, as células endoteliais deixam espaços entre si, facilitando a entrada e a saída de substratos no tumor. Alguns fármacos inativos ou profármacos, quando expostos ao tumor ativam-se devido ao seu **microambiente**, e.g. o pH dentro do tumor é mais baixo do que o das células saudáveis, pelo que alguns profármacos se conseguem ativar seletivamente dentro delas. Uma **aplicação direta** e invasiva também é possível se o tumor for facilmente acessível. Ou seja, tudo o que não implique uma modificação diretamente no fármaco está englobado neste método:

Vasculatura vazante: Toma-se partido de fenómenos de permeabilização e retenção aumentados em tumores o que os torna mais acessíveis aos anti-tumorais; A Figura 2 explica visualmente este efeito de permeação e retenção aumentada.

Microambiente tumoral: capacidade de um profármaco ou fármaco inativo de se ativar dentro da célula tumoral;



Aplicação direta: apenas possível em tumores facilmente acessíveis.

Figura 2 – Efeito de permeação e retenção aumentada em tumores.

A – vasculatura normal rodeada por células endoteliais juntas prevenindo a extravasão de NPs;

B – vasculatura de tecido tumoral hiperpermeável permitindo acumulação preferencial do fármaco dentro das células cancerígenas [6].

1.2.2. Drug delivery ativo

O *drug delivery* ativo é conseguido por ligação das NPs a um alvo ativo específico que lhe permite ter uma acumulação preferencial no tumor. Vários ligandos funcionais como anticorpos, lectinas e peptídeos ligam-se a alvos específicos das células cancerosas, e.g. associação antígeno-anticorpo [4,6].

1.3. Vantagens das NPs em relação às abordagens oncológicas convencionais

As presentes abordagens terapêuticas baseiam-se na retificação dos mecanismos nefastos dos genes ou na detenção do fornecimento de sangue ao câncer ou na destruição do próprio câncer. As opções de tratamento passam pela excisão cirúrgica das partes cancerosas, radioterapia e quimioterapia, mas todas têm as suas desvantagens. A cirurgia não pode ser aplicável a todos os tipos de cancro e podem potencialmente resultar na perda de um órgão ou em recidivas. A radiação mata as células cancerosas mas também danifica as células saudáveis circundantes. A mais comum das terapias, a quimioterapia, é uma abordagem com baixas taxas de sucesso em estados tardios do cancro devido à fraca seletividade dos princípios ativos para o cancro e toxicidade dose-dependente. Os efeitos secundários indesejáveis deixam, também, o doente visivelmente debilitado e mesmo que a terapia tenha sucesso, a possibilidade de o cancro ressurgir é considerável.

A *drug delivery* das NPs oferecem algumas vantagens em comparação com as terapias convencionais, tais como melhor tempo de prateleira, melhor biodistribuição dos fármacos e

a administração de compostos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos pelas vias oral, nasal, parenteral, e intraocular [7].

A Tabela I indica mais algumas das limitações das terapias convencionais e indica como as NPs as podem colmatar:

Tabela I – Soluções das NPs para as limitações das terapêuticas convencionais; adaptado [4].

Limitações das terapias convencionais	Soluções da nanotecnologia
<p>Toxicidade e efeitos secundários:</p> <ul style="list-style-type: none"> . Mielosupressão; . Disfunção das gónadas; . Disfunções cognitivas a longo prazo relacionadas com a quimioterapia. 	<p>Diminuição da toxicidade e de efeitos secundários:</p> <ul style="list-style-type: none"> . Tecnologias de direcionamento passivo e ativo; . Libertação controlada e seletiva no local do tumor; . Melhor eficácia e menor frequência de administração.
<p>Natureza hidrofóbica de alguns fármacos limita a sua eficácia</p>	<p>Capacidade de melhorar a solubilidade e estabilidade em água de fármacos hidrofóbicos;</p> <p>Baixa imunogenicidade;</p> <p>Melhor biodisponibilidade.</p>
<p>Desenvolvimento de resistência a fármacos</p>	<p>Nanocompósitos revestidos com inibidores das resistências dos tumores aos fármacos.</p>

2. Nanopartículas de grafeno

O grafeno (GF) é uma fina folha de carbono com hibridização sp^2 com uma espessura de apenas dois átomos que apresenta uma estrutura em forma de colmeia. É mecanicamente forte, flexível, altamente condutor de calor e eletricidade e manifesta propriedades óticas que o tornam um excelente candidato a aparelhos optoelectrónicos de nanoescala [8,9]. No entanto, para modificarmos quimicamente o GF, utilizamos um precursor – o grafeno oxidado (GO). O GO é quimicamente mais reativo que o GF e pode ser mais eficientemente

produzido em grande escala. O GO tem as suas superfícies basais decoradas com grupos hidroxilo e epóxido bem como com grupos carbonilo e carboxilo nas margens o que o torna solúvel em vários solventes [8,9,10].

2.1.Vantagens de nanocompósitos à base de GF no câncer

Embora GF e GO sejam materiais superiores aos utilizados na biomedicina, apresentam algumas limitações quando usados de forma isolada, como por exemplo:

-Requerem uma longa exposição a radiação laser potente para providenciar resultados satisfatórios na imagiologia, o que leva a danos celulares provocados por calor [8];

-As folhas de GF tendem a agregar, o que cria obstáculos nos biossensores eletroquímicos [4,10,11];

-Nos biossensores, a imobilização de proteínas em GO torna-se instável pelo que pode ser facilmente eliminado por um simples processo de lavagem [12].

Logo, é preferível que haja uma funcionalização do GF com diferentes locais ativos ao invés de se utilizar somente o composto isolado.

Podem ser encontrados na literatura alguns exemplos da funcionalização do GF. Em 2008, Yang X. *et al.* demonstraram que a nanocompostos de GO se consegue ligar até 200% da sua massa em cloridrato de doxorubicina (DOX) o que revelou uma forte interação π -stacking capaz de um grande transporte de fármacos [13]. Aliando isso a uma elevada seletividade para o alvo, libertação controlada de fármaco, biocompatibilidade e evasão ao sistema reticuloendotelial, temos perante nós um nanocomposto inteligente que supera qualquer tipo de transportador convencional [4,13-15].

Para além disso, as características óticas específicas destes nanocompósitos abrem novos horizontes na fototerapia do câncer que empregam agentes fotossensibilizantes capazes de gerar calor após exposição à luz. Porém, o aquecimento indiscriminado de células saudáveis continua a ser um risco [15].

Compósitos de GO funcionalizado com polietilenoglicol-clorine e6, foi também já usado em terapia fotodinâmica por B. Tian *et al.* com notáveis resultados na destruição de células cancerosas quando comparado com clorine e6 livre [16].

É assim possível chegarmos a uma sinergia dupla, ou até tripla, de ações teranósticas para estes nanocompósitos de GF/GO. A Figura 3 apresenta as principais aplicações dos materiais derivados do GF no câncer.

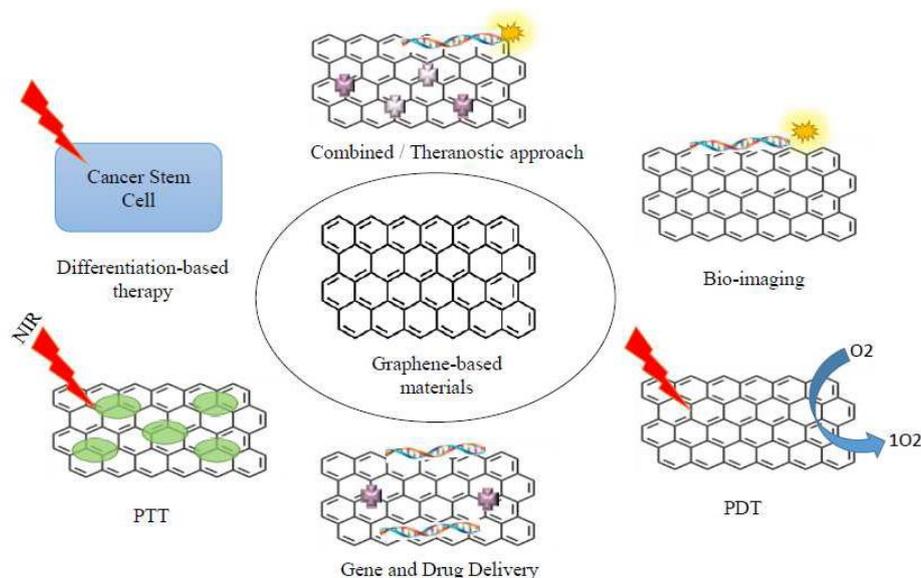


Figura 3 – Aplicações de nanocompostos de GF no câncer [4]. PTT – *Photothermal Therapy* (terapia fototérmica); PDT – *Photodynamic Therapy* (terapia fotodinâmica).

3. Métodos de síntese de nanocompósitos de GF-Au

3.1. Síntese do GF

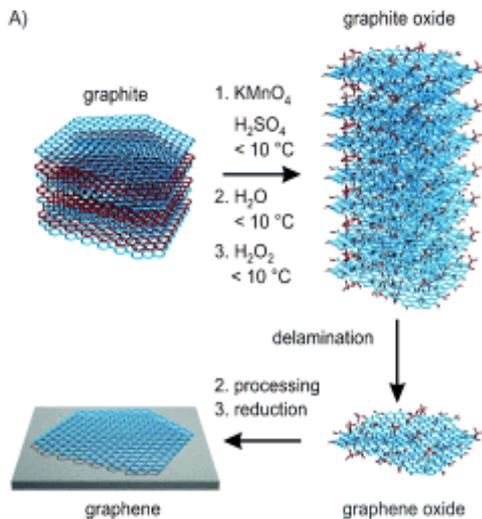
Como já discutido, o GF tem características eletrônicas, óticas, mecânicas e termais extraordinárias e tal como nos nanotubos de carbono, foi inicialmente descoberto por isolamento de grafite em massa com uso de fita adesiva.

Vários métodos de síntese do GF foram depois desenvolvidos. Com base nesta descoberta surge o primeiro método de obtenção de GF, a **exfoliação mecânica** de blocos de grafite é possível para a obtenção de GF puro; mas é, no entanto, um processo moroso e de baixo rendimento.

Outro método é o **crescimento epitaxial** através de carbetto de silício (SiC) que, embora dê grandes folhas de GF, continua a ser um processo complexo e de difícil transferência para outros substratos.

Existe ainda a **deposição de vapor químico**, que utiliza metais como Ni ou Cu para catalisar a deposição de fontes de carbono (CH_4 ou metanol) formando áreas grandes e uniformes de GF de qualidade. Ao contrário do crescimento epitaxial, este método permite uma transferência para outros substratos sem dificuldade. Estas vantagens tornam o método atrativo.

Os três métodos de obtenção de GF supraindicados são os considerados **métodos secos**. Existe também um **método não-seco** de obtenção de GF, que é o que tem maior utilização na sua preparação para posterior combinação com outros metais, que é a oxidação de grafite recorrendo a ácidos fortes (**método de Hummer**): Utilizando, por exemplo, o permanganato de potássio como oxidante em ácido sulfúrico em blocos de grafite conseguindo oxidá-los a óxido de grafite (por mecanismos ainda não totalmente compreendidos). Depois, por um processo de delaminação, facilitado por sonicação em



água, obtemos o GO que posteriormente poderá ser reduzido a GF. Esta redução é comumente conseguida através de processos de *annealing* térmico que separa o GO em CO_2 e GF. Este processo permite a formação de filmes de GF com poucas ou nenhuma falhas [8,17,18]. A Figura 4 esquematiza o método de Hummer por passos.

Figura 4 – Método de Hummer: obtenção de GF por oxidação e exfoliação [18].

3.2. Síntese de nanocompósitos GF-Au

As NPs-Au podem ser suportadas por GF, onde se enquadram a maioria dos nanocompósitos de GF-Au mas podem também ser encapsuladas no mesmo. Esta monografia cobrirá apenas o primeiro tipo, uma vez que é este que fornece a estrutura bidimensional que se pretende; é no entanto de notar que para as encapsulações das NPs-Au em GF há perspectivas de futura utilização; porém estas estruturas 3D são difíceis de manipular [4]. A Figura 5 mostra as diferentes formas de obtenção dos nanocompósitos GF-Au.

As técnicas para originar nanocompósitos de GF-ouro podem-se dividir em dois grandes grupos: *in-situ* e *ex-situ* [19].

3.2.1. Métodos *in-situ*

Os métodos *in-situ* são os mais comuns na preparação dos nanocompósitos GF-Au. Estes são eficazes, práticos e existe uma vastidão de métodos que compreendem técnicas de redução (química, micro-ondas, sonicação, deposição foto-assistida), hidrotermais,

eletroquímicos e deposição física de vapor. Como são os mais utilizados, focar-me-ei, nesta monografia, nos métodos de redução.

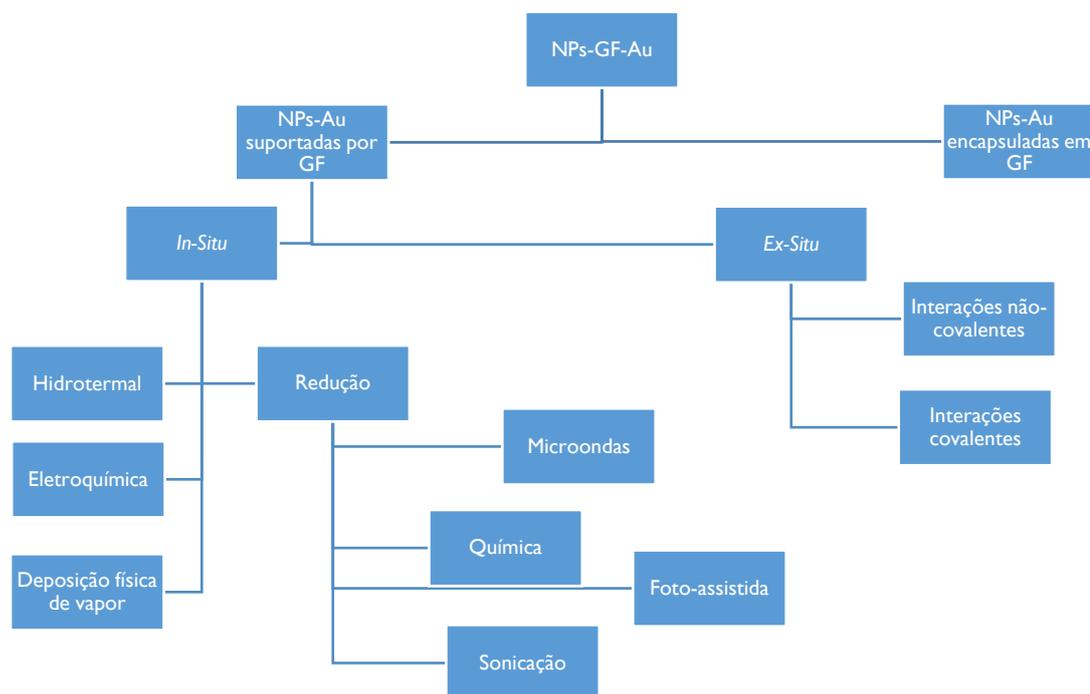


Figura 5 – esquematização das possíveis maneiras de obter nanocompósitos GF-Au. Adaptado [20].

Os métodos tradicionais de **redução química** *in-situ* de fabricar híbridos de GF consistem na mistura de uma suspensão GO seguido de redução. Este método tem a desvantagem de utilizar uma quantidade considerável de reagentes que, conseqüentemente, comprometerá a pureza da nano-construção [17,18,19]. Em 2009, B.-S. Kong, J. Geng e H.-T. Jung desenvolveram um novo método de síntese que não só resolve este problema como acrescenta valor pela sua simplicidade e custo menos oneroso.

Este novo método, baseado na técnica *Layer-by-Layer* (LbL), em português camada-a-camada, contém apenas duas etapas: 1. Obtenção de um filme de óxido de grafeno reduzido (rGO) em vácuo (sintetizado pelo método de Hummer); 2. Imersão do filme de rGO (colocado previamente num substrato de quartzo) numa solução de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. Durante este processo, as NPs de ouro são produzidas por uma redução espontânea do ião Au^{3+} . Esta redução provavelmente envolverá uma reação redox por diferença de potencial; isto é, será possível que esta redução espontânea aconteça porque as folhas de rGO carregadas negativamente cedem eletrões para reduzir o ião Au^{3+} a Au [17].

Os outros métodos de redução (micro-ondas, sonicação e deposição fotoassistida) também poupam nos agentes redutores. Estes utilizam métodos de aquecimento rápido de uma solução, utilizam quase a 100% os reagentes necessários e produzem NPs com pouca

variação de tamanhos entre si [9]. Estes métodos têm mecanismos diferentes, mas discriminá-los estaria para lá do escopo da presente monografia.

3.2.2.Método *ex-situ*

Nesta abordagem, os componentes inorgânicos são sintetizados em antemão para poderem ser montados na superfície de GF através de agentes de ligação que utilizam interações covalentes ou não-covalentes. Uma desvantagem deste método é que o GF e/ou o componente no qual o Au se integra tem que se proceder previamente a sua funcionalização para interagirem. Onde a desvantagem se torna uma vantagem é no facto de ao funcionalizarmos *a priori*, conseguimos controlar a intensidade e o tipo de interação. No caso do ouro, as ligações predominantes são as ligações π - π *stacking* e electrostáticas [4,9,21,22].

A Figura 6 mostra NPs de ouro suportadas numa folha de GF.

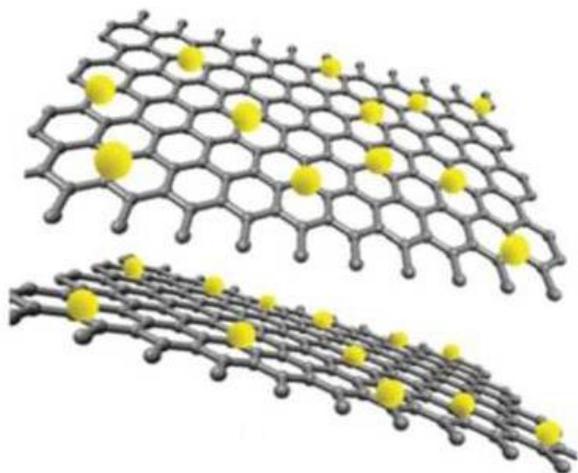


Figura 6 – Exemplo de um nanocompósito GF-ouro bidimensional. Adaptado [9].

4.Comparação dos nanocompósitos GF-Au com outras NPs

Os nanocompósitos GF-Au apresentam algumas vantagens relativamente a outras NPs. São de obtenção relativamente fácil e eficaz, de acessível funcionalização e boa biocompatibilidade quando comparados a outras NPs; Na condutividade elétrica, devido à sua grande área de superfície e à superfície condutora bidimensional π -conjugada que confere grande liberdade aos eletrões nestas orbitais; Na força mecânica, o GF é um dos materiais mais fortes tendo em conta a sua espessura; Na estabilidade e condutividade térmica o que implica que resistem bem a alterações pelo calor e transmitem-no de forma rápida [9,21].

Um efeito importante da combinação GF com Au é a amplificação do sinal de Raman. Os filmes de ouro aumentam o sinal de Raman por si só por um efeito que se denomina

Surface Enhanced Raman Scattering (SERS), mas sabe-se agora que existe uma maior amplificação desse sinal quando se utilizam NPs de Au em filmes de GF, pois este ajuda a diminuir o *background noise* associado à espectroscopia.

O Au oferece ainda fantásticas melhorias de imagiologia, incluindo fluorescência, e a nível de terapia fototérmica uma vez que absorve 5 vezes mais que outros análogos, diminuindo a energia laser necessária para a destruição celular [21,22].

O facto de estes nanocompósitos serem de fácil funcionalização favorece o aumento da sua utilização em diagnóstico, tratamento e teranóstico.

As mais-valias das NPs-GF-Au relativamente a outras análogas são, então:

1. SERS – que se traduz numa melhoria da resolução da dispersão de Raman muito importante na construção de biossensores e no diagnóstico do câncer [21];
2. Fluorescência – muito importante nalguns tipos de bioimagem;
3. Terapia fototérmica – estas NPs são das mais eficazes e menos invasivas neste tipo de terapia, sendo que absorvem 5x mais radiação que os corantes tradicionais, baixando a energia necessária para levar à morte celular [22];
4. Facilidade de síntese, modificação e caracterização – mesmo quando comparados a NPs-GF-Ag [23];
5. Biocompatibilidade bem estabelecida [23];
6. Ótima capacidade de *drug loading* – devido ao já mencionado π - π -stacking;
7. Estabilidade a oxidação [4].

Todas estas vantagens tornam as NPs-GF-Au das mais atrativas opções no diagnóstico, terapia ou teranóstico do cancro.

5. Bioimagem no câncer

Segundo a WHO, em 2015, 1 em cada 6 mortes estiveram diretamente relacionadas com o cancro (dados de fevereiro de 2017) e o número continua a aumentar. A melhor maneira de reduzir esta sinistralidade é com um diagnóstico precoce que conseqüentemente leva a um prognóstico menos sombrio.

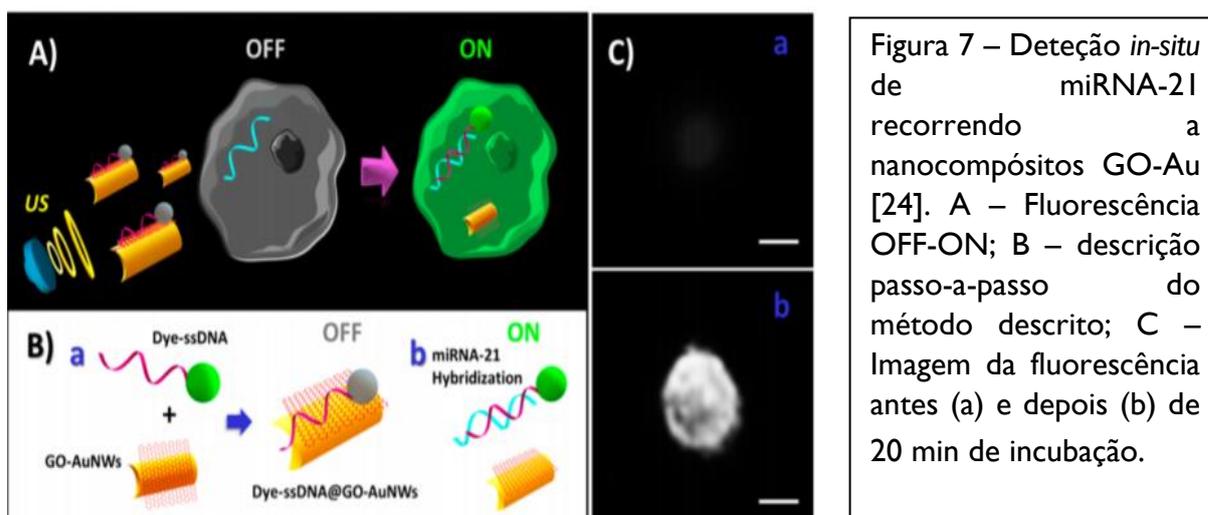
Os nanocompósitos GF-Au já se provaram como materiais úteis capazes de detetar com sensibilidade adequada diferentes compostos em diversas amostras. É possível a sua

utilização em biossensores de genes, entidades imunológicas ou proteínas tumorais específicas [9].

5.1.Exemplos

Exemplo 1: Estudo de B. Esteban-Fernández de Ávila *et al.* 2016 [24].

Neste estudo, tomou-se partido da capacidade de extinção de fluorescência de nanocompósitos de GO com nanofios de Au na deteção em tempo real de microRNA-21 (miRNA-21) (um miRNA sobre expresso no câncer). As presentes estruturas permitem a fixação de sondas fluoróforas *single-stranded DNA* (ssDNA) que por si só são vítimas deste efeito de *quenching*; após hibridização com o miRNA-21, libertam-se das NPs e emitem fluorescência detetável, como explicitado na Figura 7. Esta nova estratégia oferece, pela primeira vez uma deteção *in-situ* da expressão de miRNA em tumores em apenas poucos minutos, ao invés de horas.

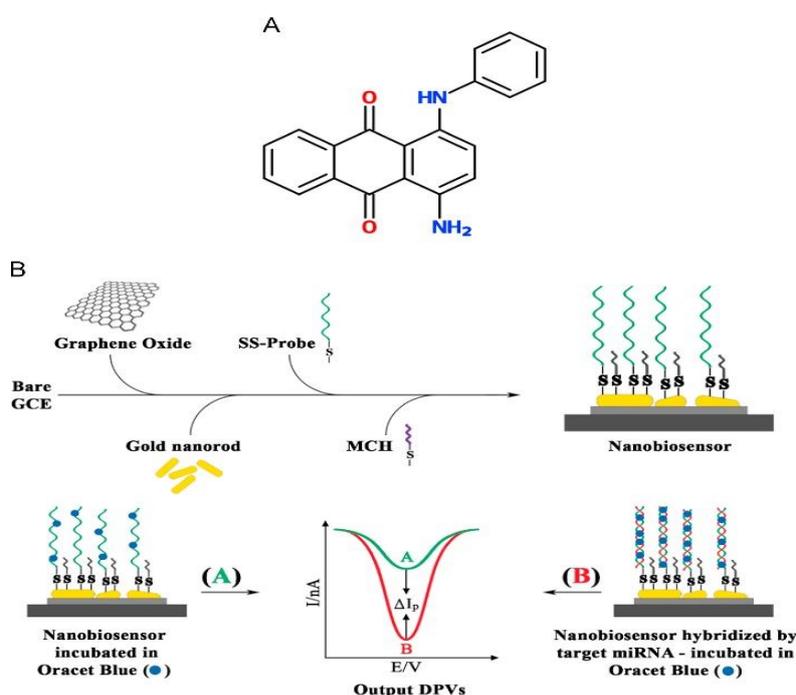


Exemplo 2: Existem estudos que recorrem a NP de GF e Au para detetar com maior resolução antígenos específicos do câncer, por exemplo o antígeno carcino-embriónico (CEA). Em 2016, D. Peng *et al.* criaram um imunossensor eletroquímico para detetar CEA. Usando uma matriz de GF-quitosano-ferroceno consegue-se uma grande área de superfície para imobilizar os anticorpos primários aumentando a intensidade do sinal. Usaram, ainda, NPs de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ como marcadores para os anticorpos secundários que ensanduichavam o antígeno entre os dois nanocompósitos aumentando imenso a sensibilidade da imunorreacção. Os resultados foram muito promissores, apresentando um limite de deteção da ordem dos 0.39 pg/mL [25].

Exemplo 3:

M. Azimzadeh *et al.* em 2016 recorreram também a compósitos de GF e NPs de Au para melhorar a sensibilidade da detecção de miRNA-155 no cancro da mama. Este miRNA é descontroladamente expresso em tumores deste tipo contribuindo para o processo carcinogénico. O que se propôs foi funcionalizar nanotubos de ouro em folhas de GO de forma a cobrir a superfície de um eléctrodo de carbono vítreo; nestes nanotubos colocou-se sondas de ssDNA que hibridizam especificamente com miRNA-155. Na solução amostra, colocou-se plasma, deixou-se hibridizar e colocou-se posteriormente a amostra numa solução de corante Azul de Oracet. Na solução controlo apenas se adicionou a solução de Azul de Oracet.

Recorrendo à voltametria de impulso diferencial calculou-se as diferenças de potencial entre amostra e controlo que corresponderiam a uma redução de sinal na amostra devido a hibridização. A Figura 8 resume o método descrito por meio de um esquema sucinto passo-a-passo. Uma relação linear em concentrações da ordem dos 2.0 fM e 8.0 pM, e um limite de detecção de 0.6 fM foram obtidos. Para além do mais, este método não



necessita de preparação prévia da amostra nem um *know-how* particularmente impressionante, o que se traduz numa simplificação do método e também numa redução drástica do tempo de preparação [26].

Figura 8 – A – estrutura do Azul de Oracet. B – Ilustração do método descrito no ensaio de M. Azimzadeh *et al.* 2016 [26].

6. Drug delivery no câncer

Como já referido, um dos grandes problemas da quimioterapia é a limitada seletividade para as células tumorais. Estudos têm sido feitos com nanocompósitos GO-Au no sentido de atingir eficazmente as células cancerígenas ao mesmo tempo que se potencia a própria ação dos fármacos utilizados.

6.1.Exemplos

Exemplo 1: Neste estudo de X. Wang *et al.* (2015) prepararam-se nanocompósitos de GO-Au nos quais se conjugou um aptâmero, o MUC-I (um conhecido biomarcador de vários tipos de cancro) e aos quais depois se adicionou doxorrubicina (DOX, agente citotóxico). Testou-se depois a capacidade citotóxica em células cancerosas destas construções com e sem exposição a luz próximo do IV [26]. Os resultados estão descritos na Figura 9, que compara a eficácia das NPs GO-Au vs NP-GO-Au-Apt vs GO-Au-Apt-DOX (com e sem luz próxima do IV).

Chegaram-se a várias conclusões neste estudo:

- Os compósitos de GO-Au são boas opções para fototerapia pela sua enorme absorção a radiações próximo do IV;
- Quando associados a aptâmeros específicos (neste caso o MUC-I) temos um veículo altamente seletivo que se acumula no câncer;

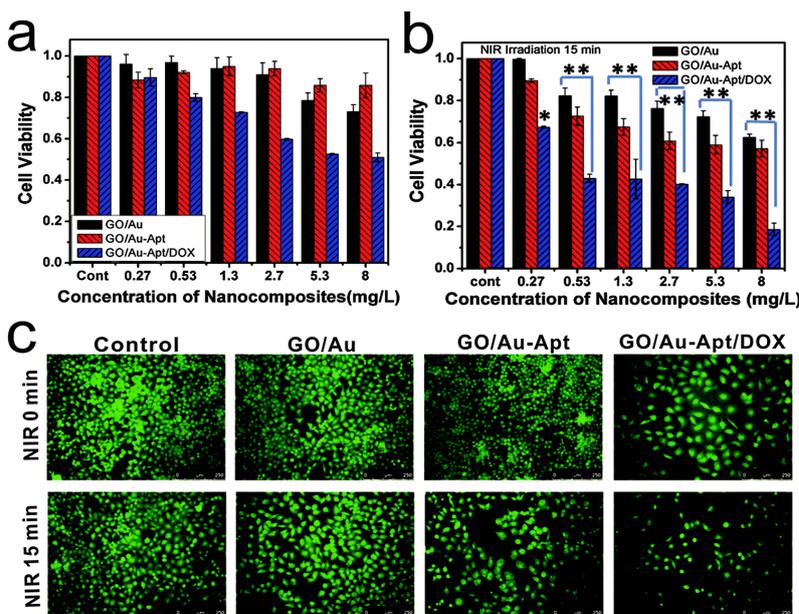


Figura 9 – Viabilidade celular de células cancerígenas incubadas com diferentes concentrações de GO-Au, GO-Au-Apt e GO-Au-Apt-DOX sem (a) e com (b) radiação próximo do IV durante 15 min. (c) Fluorescência das mesmas células incubadas com GO-Au, GO-Au-Apt e GO-Au-Apt-DOX (8 mg/L) com e sem radiação próximo do IV durante 15 min [27].

- A funcionalização de GO com DOX permite uma elevada capacidade de armazenamento de DOX;
- A termoterapia demonstrou ser muito superior na destruição tumoral do que o mesmo método sem termoterapia.

Exemplo 2: Neste exemplo aborda-se um obstáculo presente nalguns tipos de cancro, a resistência aos fármacos. Esta resistência, no caso da leucemia vem de uma sobre-expressão de glicoproteína P (conhecidos transportadores de efluxo). Em 2013, G. Zhang *et al.* [28], fizeram a seguinte experiência:

Usando linhas celulares leucêmicas multirresistentes (KA) testou-se a capacidade de se induzir a apoptose destas utilizando daunorrubicina (DNR), NPs-GF-Au associadas a anticorpos monoclonais para a glicoproteína-P (gp-P) e DNR-NPs-GF-Au-gp-P em combinação, como demonstrado na Figura 10.

Tanto dos estudos *in-vitro* como *in-vivo* verificou-se que a DNR sozinha tinha pouco efeito citotóxico na KA. No entanto, os nanocompósitos NPs-GF-Au principalmente quando associados a gp-P conseguiam não só entrar na célula devido ao processo anteriormente denominado de vasculatura vazante mas também não sofriam efluxo das glicoproteínas-P permanecendo dentro das KA; para além do mais, por mecanismos ainda não completamente conhecidos, levavam por si só a apoptose via caspase 8,3. A grande melhoria foi com a combinação de DNR-NP-GF-Au-gp-P que conseguiu penetrar, permanecer e libertar a DNR dentro das células levando a uma maior redução do tumor; este efeito era especialmente elevado na presença de glutatião (GSH); assume-se que seja pelo grupo S-H do GSH que tem mais afinidade para o nanocompósito, deslocando assim o DNR, libertando-o.

Resumindo e em termos práticos, vemos na Figura 10 os resultados *in-vivo* desta experiência em ratos-nus [28].

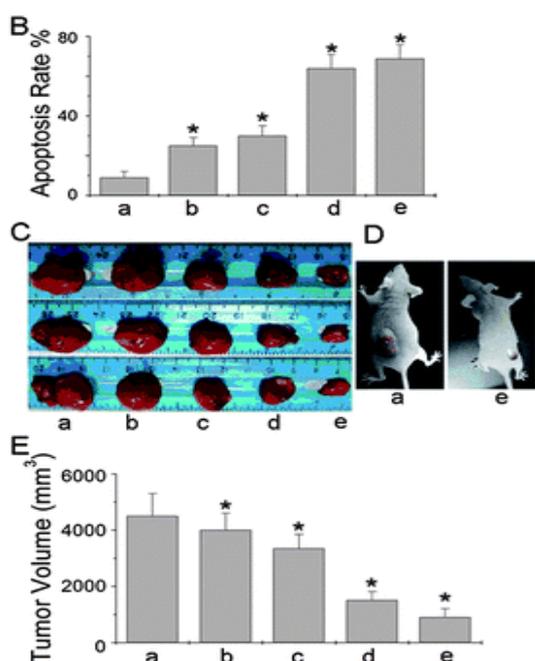


Figura 10 – (a) grupo 1: controlo; (b) grupo 2: DNR; (c) grupo 3: NPs-GF-Au-gp-P; (d) grupo 4: DNR-NPs-GF-Au-gp-P; (e) grupo 5: DNR-NPs-GF-Au-gp-P e GSH.
 (B) Análise quantitativa das células apoptóticas nos diferentes grupos; (C) Inibição do crescimento do tumor nos ratos após os tratamentos; (D) Ratos inoculados com linha celular KA; (E) Análise quantitativa do volume do tumor após os tratamentos.
 Nota: as letras minúsculas da a-e representam sempre os mesmos grupos de teste 1-5 em qualquer cenário.

Nalguns destes exemplos conseguimos ver a potencialidade das NPs-GF-Au em terapia de combinação. Usando mais do que um método para veicular fármacos e adicionando terapia fototérmica ou fotodinâmica conseguem-se melhores resultados na diminuição do câncer. Tanto a deteção como a terapêutica verão, no futuro, muito mais estudos tendo em conta as notórias vantagens que estas construções nanoscópicas oferecem.

7. Aplicações teranósticas

O termo “teranóstico” foi cunhado para definir o desenvolvimento clínico de terapias mais específicas e individualizadas para várias doenças e para combinar capacidades diagnósticas e terapêuticas para um só agente [29]. A nanotecnologia consegue ajudar a aproximar o diagnóstico da terapia e os nanocompósitos GF/GO-Au têm um conjunto de características que os tornam excelentes candidatos, tais como estabilidade, biocompatibilidade e facilidade de funcionalização [30].

Em 2013, Y. Jin e a sua equipa [31] desenvolveram umas microcápsulas multifuncionais que ilustram bem esta noção de teranóstica. Por um método de dupla microemulsão incorporaram NPs-Au em microcápsulas de poli-ácido láctico seguido de adsorção de GO na superfície via técnica LbL anteriormente descrita. Tanto *in-vitro* como *in-vivo* mostraram que estas cápsulas conseguiam melhorar a bioimagem do câncer (tanto via imagiologia por ultrassons como por tomografia computadorizada com raio-X) mas também foram exímios na fototerapia dos tumores atingindo elevadas temperaturas apenas expostos a poucos minutos de radiação próximo do IV.

A imagiologia por ultrassons providenciou uma imagem em tempo real do tumor; enquanto a tomografia ajudou a interpretar as imagens. Aliando isso a uma terapia fototérmica consegue-se: verificar o tamanho, localização do tumor, acompanhar em tempo real a sua destruição à medida que a sua temperatura aumenta evitando-se assim que as células saudáveis circundantes sejam afetadas.

Esta experiência serve para demonstrar que as NPs-GF-Au são boas ferramentas para sistemas teranósticos e podemos esperar que no futuro mais pesquisa seja feita neste género de terapia tumoral com imagiologia associada.

8. Outras potenciais aplicações terapêuticas

As características físico-químicas das NPs de GF permitem-lhe ter aplicações não só no diagnóstico e terapêutica do câncer mas também noutras áreas da biomedicina. Também na “*gene delivery*” tem havido progressos. A terapia génica não viral é uma maneira possível para tratar várias disfunções génicas. As NPs funcionalizadas de GO, principalmente, melhoram a penetração de *small interfering RNA* (siRNA) ou DNA plasmídeo em células protegendo estes ácidos nucleicos de clivagem enzimática [32].

Na engenharia de biomateriais, principalmente na produção e desenvolvimento do tecido ósseo, foram utilizadas algumas NPs de GO-Au. Um exemplo foi a capacidade de

gerar padrões lineares de GO sobre um substrato rígido de ouro para guiar a diferenciação osteogénica de células adiposas derivadas de células estaminais mesenquimais (com uma eficácia de conversão de 54.5%) [20].

Há ainda progressos no uso de NPs-GO ou NP-Au no tratamento bacteriano, mas a associação GF/GO-Au nesta área ainda é muito limitada.

9. Toxicidade e biocompatibilidade das espécies derivadas do GF

Como em todos os avanços da tecnologia biomédica, é sempre necessário fazer uma análise minuciosa da compatibilidade, da toxicidade e da clearance *in-vivo*. Os compostos derivados do GF não são exceção.

As NPs-GF, devido ao seu tamanho, chegam aos órgãos mais profundos uma vez que conseguem passar por barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica ou a barreira placentária. Na barreira hematoencefálica, por exemplo, estima-se que partículas de tamanho inferior a 100 nm consigam atravessar; esta ilação tira-se através de estudos que se fizeram com *quantum dots* de grafeno (<100 nm) [33], pelo que mais estudos de neurotoxicidade de partículas derivadas de GF são necessários para que se possam tirar as devidas conclusões.

No que toca à sua distribuição e excreção, provou-se que, em grandes quantidades, o GO se acumulava nos pulmões, no fígado, no baço e na medula; faltam, porém, estudos de longo prazo que avaliem os danos causados.

Várias características do GF, a sua concentração, a sua dimensão lateral, a estrutura da superfície, grupos funcionais, pureza e funcionalização contribuem para a sua toxicidade em sistemas biológicos [34]:

Concentração: em estudos *in-vivo*, pequenas doses de GO (0.1 mg) e doses médias (0.25 mg) não exibiram nenhuma toxicidade óbvia, mas elevadas doses (0.4 mg) induziram toxicidade crónica [35];

Dimensão lateral: Por exemplo, folhas de rGO com diâmetro de 11 ± 4 nm entram no núcleo de células mesenquimais e causam aberrações cromossómicas e fragmentação de DNA em baixas concentrações; no entanto, folhas de rGO com diâmetros de 3.8 ± 0.4 nm não exibem genotoxicidade em células mesenquimais mesmo em doses elevadas [36];

Estrutura da superfície: O GF imaculado tem uma superfície perfeitamente hidrofóbica, pelo que facilmente se agrega a si mesmo e pode levar à acumulação de compostos na superfície das células. O GO, sendo hidrofílico não sofre tanto deste

problema, no entanto, ao contrário do rGO, consegue-se inserir nos pares de base de dsDNA de dupla cadeia, o que poderá ser uma das causas da sua mutagenicidade [34];

Grupos funcionais/funcionalização: vários estudos confirmam que a funcionalização com polietileno glicol (PEG), poly-L-Lisina PEGilada, álcool polivinílico, etc. diminuem a toxicidade e melhoram a biocompatibilidade do GF. Para além do mais, GO associado a PEG diminui a agregação e retenção no fígado, pulmões e baço e ainda aumentam a clearance do GO [34].

Ainda pouco se sabe dos mecanismos de toxicidade das NP-GF e seus derivados. A Figura 10 mostra os possíveis mecanismos que se conhecem.

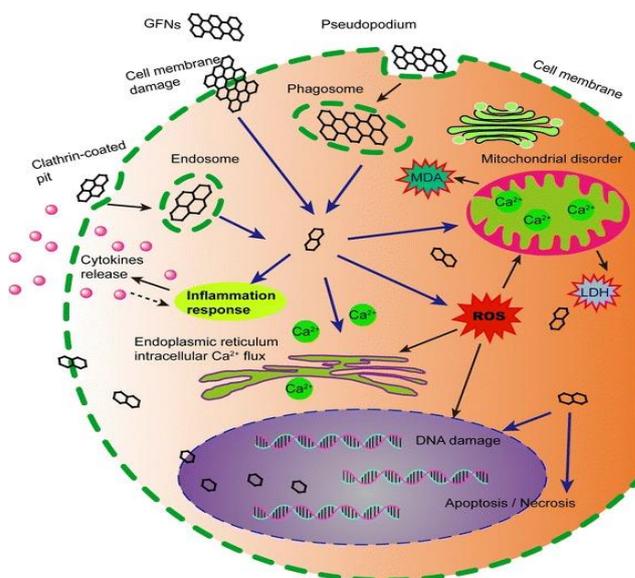


Figura 10 – Diagrama esquemático da citotoxicidade de NPs-GF e derivados. Podem entrar na célula por diferentes meios que induzem a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), aumento de lactato desidrogenase e malonilaldeído e libertação de Ca^{2+} . Subsequentemente, estas NPs causam lesões celulares: danos na membrana celular, inflamação, dano ao DNA, disfunções mitocondriais, apoptose ou necrose [34].

Na maioria dos casos o GF e o GO apresentam uma boa biocompatibilidade. Se de forma racional se desenharem NPs funcionalizadas (por exemplo, com PEG) consegue-se mitigar quase por completo os danos celulares, a agregação e aumentar a clearance dos compósitos. Em todo o caso, mais estudos toxicológicos serão necessários para se dar robustez a estas conclusões de que o GF é, de forma geral, bastante inócuo [34, 35, 37].

10. Conclusões

A corrida do combate ao cancro continua e não há falta de competidores para a disputar. A nanotecnologia tem estado na vanguarda tanto do diagnóstico como do tratamento do cancro, e nesta monografia vimos como as NPs-GF-Au têm dado a sua contribuição para a melhoria do diagnóstico e tratamento do cancro. Desde melhorias ao nível da bioimagem até ao *drug delivery*, estes nanocompósitos continuam a surpreender.

Foi notória a vantagem da combinação GF-Au em relação aos seus homólogos isolados, como estabelecem uma melhoria em relação a outros híbridos semelhantes assim como o facto de a funcionalização permitir uma vastidão de aplicações biomédicas. Destaco, principalmente, as capacidades fototérmicas e fotodinâmicas como principais aplicações destas NPs que têm surpreendido imenso nestes últimos 5 anos.

Todavia, continua a haver falta de estudos clínicos para estes compósitos, sendo que a esmagadora maioria dos estudos que têm sido realizados se focam numa análise pré-clínica. Também as dificuldades de síntese em grande escala de nanoconstruções multifuncionalizadas se tornam um entrave à produção em massa.

Com o ênfase que se tem dado ao diagnóstico precoce e ao teranóstico, não tenho dúvida que se continuam a explorar os horizontes dos nanocompósitos de GF-Au e que vejamos muito mais estudos neste âmbito a serem realizados no futuro.

Bibliografia

1. ARORA, S., RAJWADE J.M., PAKNIKAR K.M., (2012) Nanotoxicology and in vitro studies: the need of the hour. *Toxicol Appl Pharm* 258(2):151-165.
2. MIR M., SABA I., RABIA S., MARYAM K., ZEB, A., KHAN G., REHMAN A., DIN, F., et al. (2017) Nanotechnology: from In Vivo Imaging System to Controlled Drug Delivery. *Nanoscale Research Letters* 12:500.
3. BOISSEAU, P., LOUBATON B., Nanomedicine, nanotechnology in medicine, *Comptes Rendus, Physique*, 12 (2011) 620-636.
4. AL-ANI, L.A., ALSAADI, M.A., KADIR, F.A., HASHIM, N.M., JULKAPLI, N.M., YEYHE, W.A., Graphene– gold based nanocomposites applications in cancer diseases; Efficient detection and therapeutic tools, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2017).
5. WILCZEWSKA, AZ, NIEMIROWICZ, K., MARKIEWICZ, K.H., CAR, H., Nanoparticles as drug delivery systems, *Pharmacological Reports*, (2012) 64 1020-1037.
6. SINHA, R., KIM, G.J., NIE S., SHIN D.M., Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery, *Molecular cancer therapeutics*, 5 (2006) 1909-1917.
7. JABIR N.R., TABREZ, S., ASHRAF, G.M., SHAKIL, S., DAMANHOURI, G.A., KAMAL, M.A., “Nanotechnology-Based Approaches in Anticancer Research.” *International Journal of Nanomedicine* 7 (2012): 4391–4408. *PMC*. Web. 10 Sept. 2017.
8. CHANG, H., WU, H., Graphene-Based Nanomaterials: Synthesis, Properties, and Optical and Optoelectronic Applications, *Advanced Functional Materials*, 23 (2013) 1984-1997.
9. BAI, S., SHEN X., Graphene–inorganic nanocomposites, *Rsc Advances*, 2 (2012) 64-98.
10. KONIOS D., STYLIANAKIS, M.M., STRATAKIS E., KYMAKIS, E., Dispersion behaviour of graphene oxide and reduced graphene oxide, *Journal of colloid and interface science*, 430 (2014) 108-112.
11. LIU, Q., WEI, L., WANG, J., PENG, F., LUO, D., CUI, R., NIU, Y., QIN, X., LIU, Y., SUN, H., Cell imaging by graphene oxide based on surface enhanced Raman scattering, *Nanoscale*, 4 (2012) 7084-7089.

12. MAO, S., LU, G., YU, K., BO, Z., CHEN, J., Specific Protein Detection Using Thermally Reduced Graphene Oxide Sheet Decorated with Gold Nanoparticle-Antibody Conjugates, *Advanced materials*, 22 (2010) 3521-3526.
13. YANG, X., ZHANG, X., LIU, Z., MA, Y., HUANG, Y., CHEN, Y., High-efficiency loading and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide *J Phys Chem C*, 112 (2008), pp. 17554-17558.
14. WANG, Z., ZHOU, C., XIA, J., VIA, B., XIA, Y., ZHANG, F., LI, Y., XIA, L., Fabrication and characterization of a triple functionalization of graphene oxide with Fe₃O₄, folic acid and doxorubicin as dual-targeted drug nanocarrier, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 106 (2013) 60-65.
15. FENG, L., WU, L., QU, X., New horizons for diagnostics and therapeutic applications of graphene and graphene oxide, *Advanced materials*, 25 (2013) 168-186.
16. TIAN, B., WANG, C., ZHANG, S., FENG, L., LIU, Z., Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide, *ACS nano*, 5 (2011) 7000-7009.
17. KONG, B.-S., GENG, J., JUNG H.-T., Layer-by-layer assembly of graphene and gold nanoparticles by vacuum filtration and spontaneous reduction of gold ions, *Chemical Communications*, (2009) 2174-2176.
18. EIGLER, S., HIRSCH, A., Chemistry with graphene and graphene oxide—challenges for synthetic chemists, *Angewandte Chemie International Edition*, 53 (2014) 7720-7738.
19. HUANG, J., ZHANG, L., CHEN, B., JI, N., CHEN, F., ZHANG, Y., ZHANG, Z., Nanocomposites of sizecontrolled gold nanoparticles and graphene oxide: formation and applications in SERS and catalysis, *Nanoscale*, 2 (2010) 2733-2738.
20. WU, S., AN S.S., HULME, J., Current applications of graphene oxide in nanomedicine, *Int J Nanomedicine*. 2015; 10(Spec Iss): 9-24.
21. HUANG, X., QI, X., BOEY, F., ZHANG, H., Graphene-based composites, *Chemical Society Reviews*, 41 (2012) 666-686.
22. JAIN, P.K., HUANG, X., EL-SAYED, I.H., EL-SAYED, M.A., Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine, *Accounts of chemical research*, 41 (2008) 1578-1586.
23. ASHARANI, P., LOW KAH MUN, G., HANDE, M.P., VALIAVEETIL, S., Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells, *ACS nano*, 3 (2008) 279-290.

24. ESTEBAN-FERNÁNDEZ de ÁVILA, B., MARTÍN, A.D., SOTO, F., LOPEZ-RAMIREZ, M.A., CAMPUZANO, S., VÁSQUEZ-MACHADO, G.M., GAO, W., ZHANG, L., WANG, J., Single Cell Real-Time miRNAs Sensing Based on Nanomotors, *ACS nano*, 9 (2015) 6756-6764.
25. PENG, D., LIANG, R.-P., HUANG, H., QIU, J.-D., Electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen based on signal amplification strategy of graphene and Fe₃O₄/Au NPs, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 761 (2016) 112-117.
26. AZIMZADEH, M., RAHAIE, M., NASIRIZADEH, N., ASHTARI, K., NADERI-MANESH, H., An electrochemical nanobiosensor for plasma miRNA-155, based on graphene oxide and gold nanorod, for early detection of breast cancer, *Biosensors and Bioelectronics*, 77 (2016) 99-106.
27. WANG, X., HAN, Q., YU, N., LI, J., YANG, L., YANG, R., WANG, C., Aptamer-conjugated graphene oxide-gold nanocomposites for targeted chemo-photothermal therapy of cancer cells, *Journal of Materials Chemistry B*, 3 (2015) 4036-4042.
28. ZHANG, G., CHANG, H., AMATORE, C., CHEN, Y., JIANG, H., WANG, X., Apoptosis induction and inhibition of drug resistant tumor growth in vivo involving daunorubicin-loaded graphene-gold composites, *Journal of Materials Chemistry B*, 1 (2013) 493-499.
29. JIN, X., LEE, S., and CHEN, X., "Nanoparticle-Based Theranostic Agents." *Advanced drug delivery reviews* 62.11 (2010): 1064-1079.
30. GHARATAPE, A., SALEHI, R., Recent Progress in Theranostic Application of Hybrid Gold Nanoparticles, *European Journal of Medicinal Chemistry* 138 (2017), 221-223.
31. JIN, Y., WANG, J., KE, H., WANG, S., DAI, Z., Graphene oxide modified PLA microcapsules containing gold nanoparticles for ultrasonic/CT bimodal imaging guided photothermal tumor therapy, *Biomaterials*, 34 (2013) 4794-4802.
32. KHALIL, I., JULKAPLI, N.M., YEHYE, W.A., BASIRUN, W.J., BHARGAVA, S.K., Graphene-Gold Nanoparticles Hybrid—Synthesis, Functionalization, and Application in a Electrochemical and Surface-Enhanced Raman Scattering Biosensor, *Materials*, MDPI, (2016).
33. LIU, Y., XU, L.P., DAI, W., DONG, H., WEN, Y., ZHANG, X., Graphene quantum dots for the inhibition of β amyloid aggregation, *Nanoscale*. (2015) Dec 7; 7(45):19060-5.
34. LINGLING, O. BIN, S., HUIMIN, L., JIA, L., XIAOLI, F., BIN, D. TUING, S., LONGQUAN, S., "Toxicity of Graphene-Family Nanoparticles: A General Review of the Origins and Mechanisms." *Particle and Fibre Toxicology* 13 (2016): 57.

35. WANG, K., JING, R., SONG, H., ZHANG, J., YAN, W., GUO, S., CUI, D.,
Biocompatibility of graphene oxide. *Nanoscale Res Lett.* (2010);6(1):1-8.
36. AKHAVAN, O., GHADERI, E., AKHAVAN, A., Size-dependent genotoxicity of
graphene nanoplatelets in human stem cells, *Biomaterials* (2012) Nov; 33(32):8017-
25.
37. DONG, H.S., QI, S.J., Realising the potential of graphene-based materials for
biosurfaces – A future perspective. *Biosurface and Biotribology*, Volume q, Issue 4,
Dec. (2015), pp 229-248.