



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Tânia Gonçalves Mendes

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Nanomateriais como biossensores para a deteção precoce do VIH” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, da Dra. Cristina Sousa e do Professor Doutor João Leitão apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Fevereiro de 2019

Tânia Gonçalves Mendes

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Nanomateriais como biossensores para a deteção precoce do VIH”, sob a orientação, respetivamente da Dra. Cristina Sousa e do Professor Doutor João Leitão e apresentadas à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Fevereiro 2019



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Declaração de Integridade

Eu, Tânia Gonçalves Mendes, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013122984, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Nanomateriais como biossensores para a deteção precoce do VIH” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 6 de fevereiro de 2019.

Tânia Gonçalves Mendes

“Education is the most powerful weapon which you can use to change the world.”

-Nelson Mandela-

Agradecimentos

Desejo exprimir os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que, de alguma forma, permitiram que esta tese se concretizasse.

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor João Leitão, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, por ter aceite orientar-me na execução da monografia.

À equipa técnica da Farmácia Sol, por toda a disponibilidade, todos os conhecimentos transmitidos e por me terem feito sentir integrada ao longo de todo o estágio, proporcionando-me uma das melhores experiências. Toda a equipa, sem exceção, teve um enorme contributo no meu crescimento ao longo do estágio, enquanto profissional na área de farmácia comunitária.

Aos meus amigos, por me apoiarem e ajudarem sempre que possível, querendo destacar o Daniel Matos, professor na Universidade de Coimbra que sempre me apoiou quando mais precisei, assim como à Ana Catarina Antunes, estudante finalista de Engenharia Química na Universidade de Coimbra que foi imparável na sua ajuda e apoio; e à Catarina Silva, estudante de Nutrição em Leiria e à Filipa Antunes, estudante do MICEF em Coimbra, que sempre estiveram presentes ao longo de todo o meu percurso académico e foram um enorme apoio. Sem esquecer a Célia Patrício, farmacêutica, que teve um papel importantíssimo na orientação e no apoio. Acrescento um grande obrigada ao meu namorado, Alexandre Pereira, estudante do CFS F.A.P., por todo o carinho e força, por me ter ajudado a melhorar detalhes da monografia e ter sido sem dúvida um apoio gigante ao incentivar o meu espírito crítico e a ser sempre mais e melhor.

Por último, mas não menos importante, a toda a minha família pelo apoio incondicional, pela força e pelo encorajamento, sem eles nada teria sido possível. Foram sempre um grande pilar.

○ meu sincero obrigada a todos!

Tânia Mendes

Índice Geral

Agradecimentos	1
Índice Geral	2
PARTE I: Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária (Farmácia Sol)	4
Índice de Abreviaturas	5
1. Introdução	6
2. Farmácia Sol	7
2.1. Equipe	7
2.2. Localização e Horário de Serviço	7
3. Análise SWOT	8
3.1. Pontos Fortes	9
3.1.1. Equipe técnica	9
3.1.2. Projeto Kaizen	9
3.1.3. Farmácia Sol, uma Farmácia Holon	10
3.1.4. Conferência do receituário e gestão de encomendas	11
3.1.5. Novo Sifarma e Aconselhamento farmacêutico	11
3.1.6. Manipulados	13
3.2. Pontos Fracos	15
3.2.1. Dificuldade na correspondência entre nomes comerciais e respectivas substâncias ativas ou vice-versa	15
3.2.2. Dificuldade na interpretação de receitas manuais	15
3.2.3. Desconhecimento de alguns produtos e marcas	16
3.3. Oportunidades	16
3.3.1. Formações constantes	16
3.3.2. Estágio de Verão	17
3.3.3. Desenvolvimento de competências de comunicação	17
3.4. Ameaças	17
3.4.1. Locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica	17
3.4.2. Falta de medicamentos	18
4. Conclusão	19
BIBLIOGRAFIA	20

PARTE II: Nanomateriais como biossensores para a detecção precoce do HIV.....	22
Abreviaturas.....	23
Resumo	24
Abstract	25
1. Introdução.....	26
1.1. VIH/SIDA	26
1.1.1. Contextualização Histórica.....	26
1.1.2. Características do VIH.....	27
1.1.3. Formas de transmissão	29
1.1.4. A importância da detecção precoce da infecção por VIH	29
2. Nanotecnologia e Nanomateriais.....	30
2.1. Biossensores.....	31
2.1.1. Biossensores Óticos	33
- Fluorescência.....	34
- Ressonância plasmónica de superfície (SPR)	36
- Dispersão de Raman amplificada por superfície (SERS).....	38
2.1.2. Biossensores Eletroquímicos	40
- Voltametria cíclica (CV)	41
- Voltametria de onda quadrada (SWV).....	41
- Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)	41
- Voltametria de impulso diferencial (DPV)	42
- Método Híbrido	42
3. Conclusão.....	44
BIBLIOGRAFIA.....	45

PARTE I

Relatório de Estágio Curricular em Farmácia Comunitária
(Farmácia Sol)



Índice de Abreviaturas

ANF - Associação Nacional das Farmácias

DCI - Denominação Comum Internacional

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MNSRM - Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

MSRM - Medicamento Sujeito a Receita Médica

PIM - Plano Individualizado da Medicação

PVP - Preço de Venda ao Público

SNS - Sistema Nacional de Saúde

UFPE - Unidade de Atenção Farmacêutica a Pacientes Externos

I. Introdução

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Coimbra oferece a possibilidade de experimentar uma realidade profissional através dos estágios curriculares, dentro dos quais se encontram as áreas de Farmácia Comunitária, Hospitalar e Indústria Farmacêutica, antes da entrada no mercado.

Realizei estágio na área Hospitalar em Valência, Espanha, através do Programa Erasmus+ Estágios, onde tive o grande privilégio de estagiar no Hospital La Fe durante três meses, de 1 de fevereiro a 30 de abril de 2018, na área de Atenção Farmacêutica a Pacientes Externos (UFPE), onde se realiza um trabalho cooperativo, em que o farmacêutico tem um papel importante no uso dos medicamentos de forma correta, racional e responsável com o fim de conseguir ótimos resultados e melhorar a qualidade de vida com o mínimo risco de reações adversas. Houve um maior contacto com doentes oncológicos, seropositivos e com fibrose quística, entre muitos outros, mas em menor escala. Durante o tempo de estágio, fora esta realidade, fui inserida num projeto de estudo que consistia em estudar o efeito terapêutico, a aderência e o nível de satisfação dos pacientes em tratamento com Alirocumab e Evolocumab com a finalidade de baixar e estabilizar os níveis de colesterol LDL, estudo este que atingiu resultados bastante positivos. Fui avaliada no final do estágio, pela minha orientadora, o Chefe de serviço e outros farmacêuticos do serviço com uma apresentação oral deste mesmo projeto e pela memória escrita a qual foi entregue na Faculdade de Farmácia de Valência à responsável do departamento de Erasmus.

Por fim, mas não menos importante realizei o estágio em Farmácia Comunitária, em Monte Redondo, Portugal, na Farmácia Sol, inserida no grupo de Farmácias Holon, num período de 648 horas, desde 2 de maio a 12 de agosto de 2018. Esta experiência final vai ser falada pormenorizadamente ao longo do relatório onde falarei de todo o processo, desde o *backoffice* até ao atendimento, e toda a importância do papel farmacêutico nesta área que tanto contacto tem com o público.

2.Farmácia Sol

2.1. Equipa

A Farmácia Sol nasceu a 1 de setembro de 2006 e é da propriedade e Direção Técnica da Dra. Cristina Sousa. Fazendo ainda parte da sua equipa técnica: Joana Leal (Farmacêutica); Teresa Silvério (Técnica Farmácia); Andreia Silva (Técnica Farmácia); Rute Roleiro (Técnica Farmácia); Sara Augusto (Técnica Auxiliar Farmácia) e Liliana Gomes (Técnica Auxiliar Farmácia). Esta farmácia tem como lema “Farmácia Sol, saúde que nasce todos os dias” e pertence ao grupo de Farmácias Holon, como tal, dispõe de uma variedade de serviços, tópico este que será abordado mais à frente.

2.2. Localização e Horário de Serviço

Localiza-se na rua Dr. Luís Pereira da Costa, 23 Monte Redondo, Leiria, onde presta serviço à população proveniente de diversos locais: residentes da zona, utentes que habitam na periferia e pessoas provenientes de outras regiões do país ou por vezes até estrangeiros, que se deslocam à região por estarem de férias, uma vez que a Farmácia se situa perto de zonas de praia como o Pedrógão e Vieira. Encontra-se aberta e em funcionamento de 2^a a 6^a feira, desde as 9h até às 21h, sem interrupção para almoço; e ao sábado das 9h às 19h, em que da 13h às 15h se encontra fechada para o almoço.

3. Análise SWOT

Finda a breve caracterização da Farmácia Sol, segue-se um esquema representativo da análise SWOT. Esta análise divide-se numa análise interna, onde são descritos os pontos fortes (S, *Strenghts*) e os pontos fracos (W, *Weaknesses*) e numa análise externa, onde são apresentadas as oportunidades (O, *Opportunities*) e as ameaças (T, *Threats*). Como referido serão descritas as principais atividades realizadas durante este período de estágio de forma concomitante.

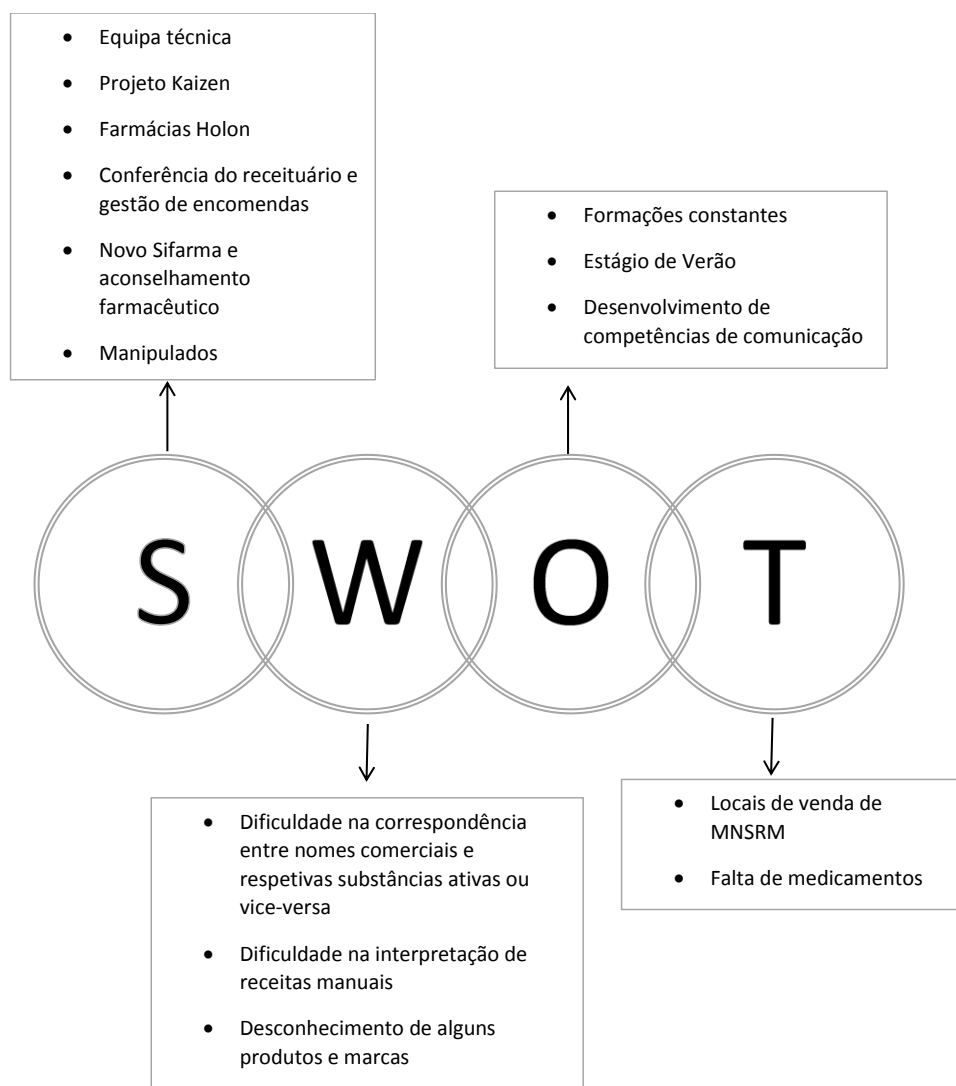


Figura 1. Esquema SWOT

3.1. Pontos Fortes

3.1.1. Equipa técnica

Considero a equipa da Farmácia Sol muito completa, apresenta muito profissionalismo, pró-ativa e sempre disposta a fazer mais e melhor. Cada elemento sabe a sua função, funções estas que vão variando por todos de forma a surgir sempre novas ideias, sempre com o intuito de melhorar a ação desempenhada. Existe também imensa entreaajuda na equipa, sendo isto uma mais valia para a organização da farmácia e para uma maior rapidez na resolução de problemas, quer no *backoffice* quer na prestação de serviços e cuidados de Saúde diretos ao utente.

Nesta farmácia aprendi que um dos fatores chave para o sucesso é sem dúvida a comunicação; e esta componente era muito trabalhada regularmente em reuniões entre toda a equipa num horário estipulado e/ou sempre que se achasse pertinente realizar a reunião. Onde os grandes objetivos eram dizer o ponto de situação em que se encontrava a farmácia, o que haveria a melhorar, a continuar ou a terminar, chamadas de atenção no sentido de ajudar a melhorar o trabalho diário das pessoas, entre outros assuntos que fossem importantes de salientar.

Fora tudo o que já foi abordado a equipa sempre se demonstrou disponível para me esclarecer dúvidas ou mesmo para dar informações e dicas que achassem importantes para o meu desempenho das funções, para que pudesse crescer enquanto futura profissional farmacêutica.

3.1.2. Projeto Kaizen

Trata-se de um método de gestão de origem japonesa criado em 1986 por Masaaki Imai. Começando por desmembrar a palavra *Kaizen* para se entender melhor o seu conceito, *Kai* significa mudar e *zen* significa melhor. Assim, *Kaizen* define-se como a prática de uma melhoria contínua. Hoje, é reconhecido a nível mundial como um pilar importante de estratégia competitiva a longo prazo para as organizações. A filosofia inerente a este projeto considera que pequenas mudanças ao longo do tempo conduzem a grandes resultados, levando assim a uma melhoria contínua, mas para tal é de elevada importância que toda a equipa esteja envolvida ao longo de todo o processo.^{1,2,3}

Na Farmácia Sol este método de gestão está implementado desde junho/julho de 2017 e até à data o balanço tem sido muito positivo. Na medida de tornar este projeto mais prático e mais visível à equipa, existe um quadro físico na farmácia onde se registam tarefas, objetivos já alcançados, sugestões de melhoria, produtos que se pretendem trabalhar, entre

muitas outras ações que são pertinentes e que ajudam os profissionais da farmácia a ter um melhor desempenho. Junto a este mesmo quadro são realizadas as reuniões *Kaizen* que foram acima mencionadas.

Este método de gestão mostra ser uma mais-valia para a Farmácia, pois consegue aumentar a produtividade, por ajudar a rentabilizar e otimizar espaços e recursos, também ajuda a eliminar desperdícios e a tornar a resolução de eventuais problemas mais rápida e eficaz. Esta filosofia torna-se uma motivação para os colaboradores, pois o espírito de equipa é muito forte, se um não desempenhar bem a sua função afeta toda a equipa e se cada um desempenhar bem a sua função, torna-se bem visível a evolução da equipa em conjunto. Cada pessoa tem voz e é deveras importante cada um expor o seu ponto de vista, expor as suas opiniões para chegarem a um consenso global e contribuírem para uma melhor gestão da Farmácia diariamente.

3.1.3. Farmácia Sol, uma Farmácia Holon

Como já referido, a Farmácia Sol pertence ao grupo de Farmácias Holon, o que lhe permite dispor de serviços especializados, serviços estes que são diferentes dos comumente oferecidos por outras farmácias. Assim, dentro dos serviços especializados, a Farmácia Sol dispõe os seguintes: consulta farmacêutica, preparação individualizada de medicação (PIM), administração de vacinas e de medicamentos injetáveis e check de saúde, os quais são fornecidos pela equipa interna da farmácia; outros serviços como o de nutrição, de pé diabético, de podologia, de dermofarmácia e reabilitação auditiva são realizados por profissionais externos à equipa, mas que frequentam com regularidade a Farmácia. Fora este ganho em serviços, também oferece uma capacidade de organizar com uma maior facilidade e frequência rastreios, assim como outras diversas ações de saúde.

Outra vantagem que o grupo de Farmácias Holon permite é a compra de produtos aos fornecedores a um preço mais baixo, permitindo assim ter maiores margens em alguns produtos que são habitualmente mais caros para outras farmácias; a possibilidade de oferecer produtos da marca Holon, que se apresentam muitas vezes como excelentes alternativas a produtos de marca conhecidos e mais dispendiosos; e o acesso a protocolos de aconselhamento farmacêutico sobre casos clínicos mais comuns que podem aparecer na Farmácia, os quais têm como função orientar e melhorar a ação farmacêutica perante tais situações de indicação farmacêutica, em que o profissional pode e deve atuar fornecendo da melhor forma possível o seu contributo ao utente de modo a melhorar a sua qualidade de vida e responder às suas necessidades.

Estes protocolos revelaram-se muito úteis, sobretudo para mim, enquanto estagiária, inevitavelmente mais inexperiente no aconselhamento farmacêutico.

3.1.4. Conferência do receituário e gestão de encomendas

Com o avanço tecnológico registado nas farmácias, relativamente às receitas, os erros associados à dispensa de medicamentos foram largamente reduzidos. No entanto, por vezes, os erros podem ocorrer pelo que é necessário estar atento e conferir sempre. Eventualmente pode ser necessário corrigir as receitas. Ao longo do estágio passei por diversas áreas importantes e uma delas foi esta, onde tinha de verificar se todos os parâmetros necessários eram cumpridos, para que as receitas fossem aceites. Para além de me ter dado a capacidade de saber conferir bem, permitiu-me ao mesmo tempo ter contacto com o nome dos medicamentos, familiarizar-me com estes e também com os múltiplos organismos de participação existentes, contribuindo para uma maior segurança no meu atendimento ao balcão e diminuindo assim a probabilidade de cometer erros no atendimento. Outra ação deveras importante no *backoffice* foi a gestão de encomendas. Tive a oportunidade de acompanhar os membros da equipa durante todo o processo de entrada de encomendas, na arrumação de medicamentos nos locais apropriados e na contagem física de produtos, o que permitiu conhecer todo o processo de gestão de *stocks*, e ter uma maior noção de onde se encontravam os produtos. A soma de tudo isto, permitiu que me fosse possível ser mais ágil e eficiente no meu desempenho.

3.1.5. Novo Sifarma e Aconselhamento farmacêutico

Numa fase inicial do meu estágio foi instalado um novo Sifarma que funciona como um *browser*. O seu modo de funcionamento é bastante intuitivo, trás vantagens em relação ao antigo como por exemplo, não ser necessário retificar os produtos de novo, caso seja necessário regressar ao procedimento anterior para introduzir um novo produto que o utente deseje ou para alterar/remover um dos inseridos na fase prévia. Com isto poupa-se muito tempo. Portanto, tive o privilégio de trabalhar tanto com o Sifarma2000® como com este novo programa, podendo comparar e aprender com ambos. O que me permitiu constatar que apesar de o programa recente trazer inúmeras vantagens, apresentava um problema a ser melhorado com a fase final de pagamento, pela caixa automática, o que fez com que por vezes, tivéssemos que trabalhar somente com o programa antigo, deixando-o um pouco de parte até que o problema se encontrasse resolvido.

Relativamente à componente do aconselhamento farmacêutico, o utente pode-se dirigir à farmácia com várias intenções, entre as quais, uma poderá ser com o intuito de pedir ajuda para uma determinada situação. Nesta situação, o farmacêutico pode mostrar o seu valor profissional, assumindo um papel preponderante, evitando que aconteçam situações, como por exemplo, a automedicação, a toma de posologias erradas ou a junção de suplementos alimentares que possam afetar uma posologia medicamentosa crónica já existente. É aqui que o farmacêutico atua, partilhando os seus conhecimentos científicos e fornecendo opções que sejam as mais indicadas à respetiva pessoa, contribuindo para uma melhor qualidade de vida do utente.

No entanto, perante uma situação de dispensa de uma receita médica, é de igual forma fundamental que o farmacêutico esteja sempre atento e pode sempre alertar e/ou transmitir todas as informações que sejam pertinentes e necessárias para a utilização do medicamento e até mesmo esclarecer dúvidas que a pessoa possa ter, adaptando a linguagem consoante o utente, pois desta forma estará a contribuir para uma maior segurança e eficácia do tratamento do utente.

Ao longo do estágio estive em contacto observacional e também executei vários casos de aconselhamento, consolidando assim a noção do papel interventivo desempenhado pelo farmacêutico. Surgiram-me algumas dúvidas relativamente à posologia, entre outras, que pude colmatar através do Sifarma2000[®] por ter uma ferramenta com grande parte da informação científica necessária. Uma vez que o meu estágio decorreu entre as estações primavera e verão, surgiram múltiplos quadros característicos de rinite alérgica, sendo frequente os utentes referirem sintomas como espirros sucessivos, prurido nasal, olhos lacrimejantes e com sinais de alguma vermelhidão. Nestes casos, onde a rinorreia era o sintoma mais incomodativo, era aconselhada a utilização de uma solução isotónica de água do mar, como o Rhinomer[®] quantas vezes fossem necessárias com o intuito de aliviar e ajudar a limpar as vias respiratórias nasais, e soro fisiológico para fornecer um alívio tanto a nível oftálmico como nasal. Em associação a um anti-histamínico H_1 , como o Telfast[®] (cloridrato de fexofenadina), que é um anti-histamínico com atividade antagonista seletiva dos recetores H_1 periféricos e por isso não tem o efeito de sedação; é importante informar que a posologia correta é de apenas um comprimido por dia, e que de preferência deve ser tomado antes da refeição e à noite. Situações como esta, estão mais associadas à Primavera, muito devido ao elevado grau de pólen que circula no ar.⁴

Como a Farmácia Sol tem localização num trajeto praticamente obrigatório para se frequentar as praias da zona, surgiram também alguns casos mais associados ao verão e à época balnear que advém desta estação, como a pitiríase versicolor, geralmente

caracterizada por manchas pequenas, com coloração branca ou acastanhada, com uma morfologia irregular, onde primeiramente é importante informar o utente que se encontra com uma infeção fúngica e as precauções que deve ter. Nesta situação pode se aconselhar a utilização de um *shampoo* especial, como o Tedol® 20 mg/mL (cetoconazol), O Tedol® deve ser utilizado uma a duas vezes por dia, aplicando nas zonas afetadas e circundantes. Devem lavar-se as zonas afetadas da pele, deixar atuar durante 5 minutos e enxaguar. Se a situação não melhorar ou agravar dentro de duas semanas (duração da posologia nesta situação), o tratamento deve ser reavaliado e aí o farmacêutico deve sugerir que o utente se dirija ao médico, uma vez que a toma de um antifúngico oral pode ser necessária em casos de maior gravidade.⁵

3.1.6. Manipulados

Segundo a Portaria n.º 594/2004, que aprova as boas práticas a executar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar, um medicamento manipulado define-se como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”.⁶

Com a execução de medicamentos manipulados, é possível fazer o ajuste da terapêutica para um determinado doente, preenchendo lacunas a nível de formas farmacêuticas, ou fazendo associações de substâncias inexistentes no mercado, ou até mesmo dosagens que sejam indicadas para crianças ou também para animais e que não existam no mercado.

As farmácias devem ter instalações adequadas assim como o material necessário para a preparação de medicamentos manipulados, tendo em conta a natureza dos produtos, as formas farmacêuticas pretendidas e a dimensão dos lotes preparados. O laboratório onde ocorrem as operações de preparação, acondicionamento, rotulagem e controlo de medicamentos manipulados deverá ter as condições ideais de iluminação, ventilação, de temperatura e humidade adequadas, assim como as respetivas superfícies de fácil limpeza.

Ao longo do curso senti que tive uma boa formação base acerca do processo global da preparação de um medicamento manipulado, formação esta que fui adquirindo e consolidando com a ajuda das disciplinas como Farmácia Galénica, no entanto foi na Farmácia Sol que pude experienciar pela primeira vez num contexto profissional. Apesar de nesta Farmácia não se proceder à execução de uma larga escala de medicamentos manipulados, sempre que possível, quando surgia a oportunidade pude acompanhar de perto a preparação de medicamentos manipulados e proceder à preparação de um, que consistiu

num creme de aplicação tópica. As etapas fundamentais da preparação de qualquer um dos manipulados podem ser resumidas nos seguintes tópicos (Anexo I):

- A. Preparação do manipulado segundo as condições e regras necessárias para a execução da fórmula magistral ou a fórmula oficial e o preenchimento da sua ficha de preparação; ao longo da ficha de preparação vão ser descritas as matérias-primas utilizadas, neste passo é importante indicar o lote, o fornecedor e a quantidade pesada e validade. O próximo passo é indicar os procedimentos de manipulação, o controlo de qualidade efetuado que pode passar por ensaios de verificação das características organolépticas e da quantidade de acordo com a monografia, o material de embalagem utilizado, o prazo de utilização e as condições em que deve ser conservado consoante as características do manipulado (como por exemplo se é necessário conservar ao abrigo da luz se for fotossensível, à temperatura ambiente, em ambiente seco, etc.); E por fim preencher o nome e morada do doente e o nome do prescritor.
- B. Rotulagem. O rótulo deve conter diversas informações, nomeadamente a denominação do medicamento e o teor em substância ativa; a quantidade dispensada e o número de lote, a via de administração, a posologia, a data de preparação, a identificação do diretor técnico, do médico e do utente, bem como a identificação, o endereço e o telefone da Farmácia. Ainda sobre o preparado deve conter o prazo de utilização; excipientes, dentro desta categoria é importante salientar se contém alguma substância relevante; as condições de conservação e eventuais advertências que possam existir.
- C. O preço. O cálculo do preço passa por um somatório das matérias-primas mais os honorários de manipulação, o material de embalagem e por fim o PVP do medicamento manipulado.
- D. Dispensa do medicamento manipulado. Na fase final, mas não menos importante, é de extrema relevância prestar o aconselhamento farmacêutico necessário ao utente para que este execute de forma correta a posologia do medicamento manipulado para garantir a eficácia e a sua segurança.

3.2. Pontos Fracos

3.2.1 Dificuldade na correspondência entre nomes comerciais e respectivas substâncias ativas ou vice-versa

Uma das dificuldades que senti numa fase mais inicial do atendimento ao balcão foi a incapacidade de fazer a interligação dos nomes comerciais dos medicamentos às respectivas substâncias ativas ou vice-versa. O que desencadeou alguma insegurança, visto que se tornava um pouco uma barreira na comunicação com o utente, na medida em que não podia prestar aconselhamento ou esclarecimentos de dúvidas sem ter em primeiro lugar o conhecimento de que substância ativa se tratava, ou o oposto, como no caso de prescrições por Denominação Comum Internacional (DCI), de tentar sugerir alguns nomes comerciais para que o utente conseguisse compreender qual o medicamento a que me tentava referir. Contudo, com o apoio da ferramenta “Informação Científica” do Sifarma2000®, onde é possível obter a informação necessária rapidamente; acoplando a experiência e o desempenho de funções na gestão de encomendas, essa lacuna foi colmatada de forma gradual.

Como uma substância ativa pode ter várias aplicações/funções, a correspondência com a indicação terapêutica nem sempre era algo imediato, o que também contribuiu para alguma insegurança. No entanto, mais uma vez, a experiência e mesmo a revisão em casa da componente farmacológica que foi dada ao longo do curso MICEF, em cadeiras como Farmacologia II e Farmácia Clínica principalmente, ajudaram imenso a contornar esta adversidade.

3.2.2. Dificuldade na interpretação de receitas manuais

A informatização das receitas levou a uma diminuição abrupta dos erros de dispensa. Como tal, sempre que surgiam receitas manuais, senti algum receio de errar. O que contribuiu para a insegurança sentida, passava muito pela falta de cuidado do médico prescriptor no preenchimento das mesmas, tornando-se muitas vezes ilegíveis. Por este motivo, e como forma de precaução, quando surgiam receitas manuais procedia sempre que possível à dupla verificação com um profissional da equipa da Farmácia, com o intuito de garantir que estava a dispensar o medicamento certo, na dose pretendida e na forma farmacológica correta.

3.2.3. Desconhecimento de alguns produtos e marcas

Numa fase inicial do estágio deparei-me com uma enorme quantidade e variedade de produtos, desde medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM), medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM), produtos de puericultura, de higiene oral, de higiene íntima, dermocosmética (e todas as suas gamas inerentes), veterinária, ortopédicos, meias de descanso/compressão, material de primeiros socorros e tantos outros exemplos. Assim era de esperar, uma vez que as Farmácias são estabelecimentos da área de saúde muito completos que tentam ir de encontro à maioria das necessidades dos utentes. No entanto, apesar de ter esta noção da realidade, inevitavelmente foi uma das minhas dificuldades, dada a imensidão tanto em quantidade como em variedade dos produtos existentes na Farmácia. Apesar de já ter realizado previamente estágio de Verão em farmácia comunitária, senti que o conhecimento a nível de marcas e variedades de produtos só se adquire com tempo e experiência profissional. Considero que o MICEF também nos poderia preparar um pouco melhor, principalmente em áreas como puericultura, cosmética e veterinária.

3.3. Oportunidades

3.3.1. Formações constantes

Assisti a um leque considerável de formações internas através de delegados de informação médica. Estes delegados deram pequenas formações internas na Farmácia, apresentando novos produtos ou relembrando as propriedades dos já existentes, salientando o que os distingue de outros produtos do mercado. Ainda dentro destas formações internas, tive acesso a uma outra, dada por uma farmacêutica especializada na área de dermofarmácia, onde aprofundei os meus conhecimentos no campo da psoríase e da urticária. Usufruí também de uma formação online, por parte da ANF, com o intuito de me ajudar a ambientar e compreender melhor o método de funcionamento do novo Sifarma. O que se tornou bastante útil, pois permitiu-me obter um melhor desempenho no atendimento ao balcão.

A nível de formações externas, tive o privilégio de poder frequentar um encontro das farmácias Holon, no casino da Figueira da Foz, onde não faltaram apresentações e esclarecimentos de uma gama variadíssima de produtos e marcas, assim como não poderia faltar, foi também explicado todo o conceito Holon. Também muito enriquecedora, foi outra formação da marca ISDIN, no Hotel EuroStar, em Leiria, onde fiquei a conhecer de forma bastante detalhada e explícita a gama de produtos da marca, as suas respetivas funções e os diferentes públicos a que se destinam.

Posso afirmar, que estas oportunidades que me foram possibilitadas ao longo do estágio, foram sem dúvida um ponto muito positivo. Uma vez que consegui obter conhecimentos teóricos e posteriormente aplicá-los na prática profissional. Este processo fez toda a diferença, mudou sem dúvida a minha postura por me permitir sentir mais segura e confiante, o que me levou a desempenhar melhor o meu papel enquanto profissional farmacêutica.

3.3.2. Estágio de Verão

A Farmácia Sol para além de me ter permitido realizar o estágio curricular, também me possibilitou a oportunidade de realizar um estágio de verão prévio. O que me deu um impulso no desenvolvimento durante o estágio curricular aqui realizado. Por já me encontrar um pouco familiarizada com a filosofia e funcionamento da farmácia; somando o facto de já conhecer os membros da farmácia, o que também senti que contribuiu imenso para a minha progressão e confiança no desempenhar das atividades ao longo do meu percurso.

3.3.3. Desenvolvimento de competências de comunicação

Ao longo do estágio senti que, a nível pessoal, adquiri novas competências a nível de comunicação. O que me possibilitou arranjar ferramentas e modos de me conseguir adaptar a cada utente. Cada caso é um caso e cada pessoa é singular, pelo que é fundamental uma constante adaptação na comunicação, no entanto, existem pontos chave como: confiança, empatia e postura profissional, tudo acompanhado de boa disposição.

3.4. Ameaças

3.4.1. Locais de venda de medicamentos não sujeitos a receita médica

O Decreto-Lei n. °134/2005, de 16 de agosto, veio permitir a venda de medicamentos não sujeitos a receita médica (MNSRM) em locais fora das farmácias, devidamente autorizados pelo INFARMED e que cumpram os requisitos legais exigidos. Estes estabelecimentos comerciais têm crescido consideravelmente em número nos últimos anos. O que representa uma enorme ameaça para a sustentabilidade das farmácias.

No entanto, há que encarar estas ameaças como desafios. Para tal deve se trabalhar diariamente para se conseguir ultrapassar este obstáculo. Focando nos pontos positivos, a Farmácia Sol, por pertencer ao grupo de farmácias Holon, tem a possibilidade de oferecer PVPs mais competitivos, o que é uma grande vantagem. Para além disso, aposta igualmente

em estratégias de fidelização dos utentes, como por exemplo, a confirmação telefónica da marcação dos serviços, ofertas de rastreios e/ou serviços a clientes, feiras da saúde onde se realizam imensos *check-ups* de saúde, oferta de um cartão da Farmácia para o utente ir registando os seus valores de tensão arterial, colesterol total e glicémia sempre que fizer o seu *check-up*; *workshops* em escolas, caminhadas, a elaboração de PIM's (Anexo II), que apesar de não trazer grande lucro à farmácia, acaba por ser uma forma de fidelização do utente e a consulta farmacêutica. Em suma, a Farmácia Sol tenta sempre inovar e ter um contacto mais próximo com os seus utentes, sempre com o objetivo de chegar às suas necessidades e contribuir para uma melhoria na qualidade de vida dos mesmos. Este último tópico é de realçar, pois o profissional farmacêutico ao desempenhar o seu papel de oferecer os seus conhecimentos e esclarecimento de eventuais dúvidas, cria a enorme distinção entre a compra de produtos numa farmácia e a compra nesses estabelecimentos, onde o aconselhamento não existe.

3.4.2. Falta de medicamentos

Infelizmente, a falta de medicamentos nas farmácias portuguesas continua a ser uma realidade. O que constitui uma ameaça para a saúde pública, comprometendo a terapêutica de muitos utentes. O facto de muitos medicamentos se esgotarem no nosso mercado nacional, deve-se ao facto de apresentarem um PVP baixo, o que os torna atrativos para a sua exportação para outros mercados estrangeiros, onde o PVP praticado é muito superior. Como os laboratórios só vendem a nível nacional, o número de embalagens correspondentes à quota de mercado leva a que a sua falta seja frequente. O INFARMED tem tentado colmatar esta falta, mas a existência de livre circulação de bens e mercadorias continua a levar a que este acontecimento ocorra apesar dos esforços feitos. Uma das tentativas para a resolução desta situação foi a criação da Via Verde do medicamento. O que faz com que os laboratórios sejam um pouco obrigados a manter o *stock* de segurança nos distribuidores grossistas para satisfazer as encomendas que têm associado ao número da receita, no entanto, ainda não é muito abrangente.

O que torna tudo isto uma ameaça, é a falta de compreensão por parte dos utentes. Presenciei ao longo do estágio, situações em que por mais que se explique com toda a paciência e calma a situação, o utente acaba muitas vezes por responsabilizar a farmácia e por vezes dirige-se a outra farmácia para tentar solucionar o seu problema.

4. Conclusão

O término do estágio curricular, simbolizou o fim de uma experiência incrível onde senti que adquiri inúmeras capacidades no campo de farmácia comunitária e tive o privilégio de estar rodeada de pessoas que partilhavam um mesmo objetivo comum, ser mais e melhor todos os dias. Apesar de só ter tido uma duração de 648 horas, o que levo daqui não tem medição possível, sei que vou muito enriquecida em diversos níveis, o que tudo devo a cada pessoa da equipa da Farmácia Sol, farmácia esta que faz jus, sem dúvida, ao nome que tem.

Ao longo deste estágio para além da oportunidade que tive em desenvolver as minhas competências como já referido, também aprendi ao longo da minha experiência que as farmácias são um local de preferência para muitas pessoas, onde depositam a sua confiança por se sentirem seguras, por sentirem que têm a atenção devida e o aconselhamento farmacêutico especializado. O que me mostrou que o farmacêutico se consegue distinguir e marcar a sua posição na sociedade de uma forma muito positiva. Espero que este legado continue e sempre a crescer, para tal um farmacêutico tem que ser inteiro e trabalhar constantemente numa evolução para poder estar ao nível das expectativas. Já o Sr. Presidente da República Marcelo Rebelo Sousa dizia “ser farmacêutico não é só uma profissão, é uma vocação!”

Posto isto, com o término desta experiência, todo o meu percurso académico termina também. É o fim de um capítulo, mas é igualmente o início de um novo, com muitas páginas em branco, no qual espero conseguir desempenhar as minhas funções enquanto profissional farmacêutica da melhor forma possível e sempre em constante evolução.

Não posso terminar sem mais uma vez agradecer a toda a equipa técnica da Farmácia Sol, por tudo o que fez por mim, toda a disponibilidade, todos os conhecimentos transmitidos e por me ter permitido finalizar o meu percurso nesta Farmácia.

BIBLIOGRAFIA

1. TETTEH, H. A. Kaizen: - A Process Improvement Model for the Business of Health Care and Perioperative Nursing Professionals. *AORN J.* **95**, (2012) 104–108.
2. CHERRIE, J. W. Kaizen. *Ann. - Work Expo. Heal.* **61**, (2017) 398–400.
3. Kaizen institute. - **Quem somos: O que é Kaizen?** [Acedido a 28 de Agosto de 2018]. Disponível na internet: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
4. INFARMED - **Resumo das características do medicamento - Telfast 120 mg.** [Acedido a 30 de junho de 2018]. Disponível na Internet:
http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8350&tipo_doc=fi
5. INFARMED - Resumo das características do medicamento - Tedol 20mg/mL [Acedido a 28 de Agosto]. Disponível na Internet:
http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8332&tipo_doc=fi
6. INFARMED - **Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho.** [Acedido a 30 de Agosto de 2018]. Disponível da internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a

ANEXO I

Manipulados – Ficha do produto

LOGOTIPO DA FARMÁCIA Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 1 de 4

Medicamento: _____
Tubo em subembalagem(s) activado(s) _____ mg/ml ou unidades/ml _____ g/ml de _____
Forma farmacéutica: _____ Data de preparação: _____
Número do lote: _____ Quantidade a preparar: _____

Material prima	Lote nº	Quantidade para 100 g/ml ou unidades/ml	Quantidade utilizada	Quantidade produzida	Substância de referência nº _____	Substância de referência nº _____

Preparação: _____
1. _____
2. _____
3. _____
4. _____
5. _____
6. _____
7. _____
8. _____
9. _____

Embalagem: _____
Tipo de embalagem: _____
Capacidade do recipiente: _____
Material de embalagem: _____ Nº do lote: _____ Origem: _____
Operador: _____

IMP 10.2

LOGOTIPO DA FARMÁCIA Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 3 de 4

Cálculo do preço de venda

Material prima	Substâncias essenciais em solução	Substâncias de referência nº _____	Quantidade produzida	Preço de aquisição	Preço de venda	Substância de referência nº _____	Substância de referência nº _____	Substância de referência nº _____

MONEDIMENSIONAMENTO DE MANIPULAÇÃO

Forma farmacéutica	Quantidade	F.P.M.	Substância de referência nº _____	Substância de referência nº _____

MATERIAL DE EMBALAGEM

Material de embalagem	Preço de aquisição (R\$)	Quantidade	Substância de referência nº _____	Substância de referência nº _____

PREÇO DE VENDA AO PÚBLICO DO MEDICAMENTO MANIPULADO

JA + B + C + D + E + F + G + H + I + J + K + L + M + N + O + P + Q + R + S + T + U + V + W + X + Y + Z + AA + AB + AC + AD + AE + AF + AG + AH + AI + AJ + AK + AL + AM + AN + AO + AP + AQ + AR + AS + AT + AU + AV + AW + AX + AY + AZ + BA + BB + BC + BD + BE + BF + BG + BH + BI + BJ + BK + BL + BM + BN + BO + BP + BQ + BR + BS + BT + BU + BV + BW + BX + BY + BZ + CA + CB + CC + CD + CE + CF + CG + CH + CI + CJ + CK + CL + CM + CN + CO + CP + CQ + CR + CS + CT + CU + CV + CW + CX + CY + CZ + DA + DB + DC + DD + DE + DF + DG + DH + DI + DJ + DK + DL + DM + DN + DO + DP + DQ + DR + DS + DT + DU + DV + DW + DX + DY + DZ + EA + EB + EC + ED + EE + EF + EG + EH + EI + EJ + EK + EL + EM + EN + EO + EP + EQ + ER + ES + ET + EU + EV + EW + EX + EY + EZ + FA + FB + FC + FD + FE + FF + FG + FH + FI + FJ + FK + FL + FM + FN + FO + FP + FQ + FR + FS + FT + FU + FV + FW + FX + FY + FZ + GA + GB + GC + GD + GE + GF + GG + GH + GI + GJ + GK + GL + GM + GN + GO + GP + GQ + GR + GS + GT + GU + GV + GW + GX + GY + GZ + HA + HB + HC + HD + HE + HF + HG + HH + HI + HJ + HK + HL + HM + HN + HO + HP + HQ + HR + HS + HT + HU + HV + HW + HX + HY + HZ + IA + IB + IC + ID + IE + IF + IG + IH + II + IJ + IK + IL + IM + IN + IO + IP + IQ + IR + IS + IT + IU + IV + IW + IX + IY + IZ + JA + JB + JC + JD + JE + JF + JG + JH + JI + JJ + JK + JL + JM + JN + JO + JP + JQ + JR + JS + JT + JU + JV + JW + JX + JY + JZ + KA + KB + KC + KD + KE + KF + KG + KH + KI + KJ + KL + KM + KN + KO + KP + KQ + KR + KS + KT + KU + KV + KW + KX + KY + KZ + LA + LB + LC + LD + LE + LF + LG + LH + LI + LJ + LK + LL + LM + LN + LO + LP + LQ + LR + LS + LT + LU + LV + LW + LX + LY + LZ + MA + MB + MC + MD + ME + MF + MG + MH + MI + MJ + MK + ML + MM + MN + MO + MP + MQ + MR + MS + MT + MU + MV + MW + MX + MY + MZ + NA + NB + NC + ND + NE + NF + NG + NH + NI + NJ + NK + NL + NM + NN + NO + NP + NQ + NR + NS + NT + NU + NV + NW + NX + NY + NZ + OA + OB + OC + OD + OE + OF + OG + OH + OI + OJ + OK + OL + OM + ON + OO + OP + OQ + OR + OS + OT + OU + OV + OW + OX + OY + OZ + PA + PB + PC + PD + PE + PF + PG + PH + PI + PJ + PK + PL + PM + PN + PO + PP + PQ + PR + PS + PT + PU + PV + PW + PX + PY + PZ + QA + QB + QC + QD + QE + QF + QG + QH + QI + QJ + QK + QL + QM + QN + QO + QP + QQ + QR + QS + QT + QU + QV + QW + QX + QY + QZ + RA + RB + RC + RD + RE + RF + RG + RH + RI + RJ + RK + RL + RM + RN + RO + RP + RQ + RR + RS + RT + RU + RV + RW + RX + RY + RZ + SA + SB + SC + SD + SE + SF + SG + SH + SI + SJ + SK + SL + SM + SN + SO + SP + SQ + SR + SS + ST + SU + SV + SW + SX + SY + SZ + TA + TB + TC + TD + TE + TF + TG + TH + TI + TJ + TK + TL + TM + TN + TO + TP + TQ + TR + TS + TT + TU + TV + TW + TX + TY + TZ + UA + UB + UC + UD + UE + UF + UG + UH + UI + UJ + UK + UL + UM + UN + UO + UP + UQ + UR + US + UT + UU + UV + UW + UX + UY + UZ + VA + VB + VC + VD + VE + VF + VG + VH + VI + VJ + VK + VL + VM + VN + VO + VP + VQ + VR + VS + VT + VU + VV + VW + VX + VY + VZ + WA + WB + WC + WD + WE + WF + WG + WH + WI + WJ + WK + WL + WM + WN + WO + WP + WQ + WR + WS + WT + WU + WV + WW + WX + WY + WZ + XA + XB + XC + XD + XE + XF + XG + XH + XI + XJ + XK + XL + XM + XN + XO + XP + XQ + XR + XS + XT + XU + XV + XW + XX + XY + XZ + YA + YB + YC + YD + YE + YF + YG + YH + YI + YJ + YK + YL + YM + YN + YO + YP + YQ + YR + YS + YT + YU + YV + YW + YX + YY + YZ + ZA + ZB + ZC + ZD + ZE + ZF + ZG + ZH + ZI + ZJ + ZK + ZL + ZM + ZN + ZO + ZP + ZQ + ZR + ZS + ZT + ZU + ZV + ZW + ZX + ZY + ZZ

PREÇO FINAL: R\$ _____

Substância de Referência: _____

IMP 10.2

LOGOTIPO DA FARMÁCIA Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados Página 2 de 4

Prazo de validade e Condições de conservação

Condições de conservação: _____
Operador: _____

Prazo de validade: _____
Operador: _____

Fertilização

ENLACE	EXERCÍCIO	RESPOSTA	Material de Referência nº _____

Aprovado: _____
Rejeitado: _____

Nome, matrícula e rubrica do docente: _____

Nome do prescriptor: _____

Assinatura: _____

IMP 10.2

ANEXO II

Plano individualizado da medicação (PIM)



PARTE II

Nanomateriais como biossensores para a
deteção precoce do HIV

Abreviaturas

Ag - Prata

Anti-P24 - Anticorpo para o p24

Au - Ouro

AuNPs - Nanopartículas de ouro

AuNRs - Nanobastões de ouro (do inglês *nanorods of gold*)

BCA - Bio código de barras (do inglês *biobarcode assay*)

CCR5 Δ 32 - Mutação delta 32 do recetor C-C da quimiocina tipo 5

CRF - Forma circulante recombinante do subtipo M do HIV-1

CV - Voltametria cíclica

DPV - Voltametria de impulso diferencial

EIS - Espectroscopia de impedância eletroquímica (ou **AC** - Impedância de Corrente Alternada)

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FACS - Classificação de células ativadas por fluorescência (do inglês *Fluorescence-activated cell sorting*)

FNBs - Esferas poliméricas nanométricas fluorescentes

HRS - Dispersão de *Hyper-Rayleigh*

LFA - Ensaio de Fluxo Lateral (do inglês *Lateral Flow Assays*)

LOD - Limite de detecção

LTR - Repetição de terminal longa

MBs - Esferas magnéticas

MS - Sentinela molecular

NMs - Nanomateriais

NNI - *National Nanotechnology Initiative* (Projeto Americano)

NPs - Nanopartículas

NRs - Nanobastões (do inglês *nanorods*)

PRLS - Dispersão de luz por

ressonância plasmónica (do inglês *Plasmon Resonance Light Scattering*)

PSA - Antígeno específico da próstata

p24 - Antígeno da cápside VIH-1

QP - Ponto quântico (do inglês *Quantum dots* – QD)

SERS - Dispersão de Raman amplificada por superfície (do inglês *Surface-Enhanced Raman Scattering*)

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia (SIVcpz- dos chimpanzés, SIVgor-dos gorilas)

SPR - Ressonância plasmónica superficial (do inglês *Surface Plasmon Resonance*)

SWV - Voltametria de onda quadrada

UNAIDS - Programa das Nações

Unidas sobre HIV/SIDA (*Joint United Nations Program on HIV/AIDS*)

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana [tipo 1 (VIH-1) e 2 (VIH- 2)]

Resumo

Os sensores e/ou biossensores são dispositivos analíticos aplicados em diferentes áreas como nomeadamente na área biomédica para a deteção de vírus.

Os vírus são dos agentes infecciosos que apresentam dimensões mais pequenas, podendo causar inúmeras doenças, tais como a ébola, a gripe comum, a meningite e a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), entre outras. A SIDA é uma das doenças pandémicas globais, e resulta da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH). Se o tratamento antirretroviral adequado for selecionado numa fase precoce da infeção, tanto o risco de contrair SIDA como o de transmissão do vírus conseguem largamente ser reduzidos. A alta prevalência de doenças como esta, a par doutras, muito se deve à falta de meios e de ferramentas que propiciem uma deteção eficaz, rápida e seletiva.

Nesta monografia, será demonstrada a possibilidade de se atingir este objetivo com a utilização de nanomateriais, através da deteção do vírus num estágio precoce da infeção. Serão então apresentados nanobiossensores, biossensores baseados em nanopartículas, que se pensam ter estas características, os quais poderão vir a mudar radicalmente a realidade de deteção do VIH.

Palavras-chave: Nanomateriais, biossensores, VIH, SIDA, deteção do VIH.

Abstract

The sensors and/or biosensors are analytical devices applied in different areas such as the biomedical area for virus detection.

Viruses are among the smallest infectious agents that can cause numerous diseases like Ebola, Common Flu, Meningitis, Acquired Immune Deficiency Syndrome among many more. AIDS is one of the global pandemic diseases that results from HIV infection, if an adequate antiretroviral treatment is selected at an early stage of infection, the risk of obtaining AIDS and even transmission is largely reduced. The high prevalence of diseases like this one, among others, is largely due to the lack of means and tools that provide rapid, effective and selective detection. In this monography it will be shown the possibility of reaching this goal by detecting the virus at an early stage with the use of nanomaterials.

It will be presented nanobiosensors that are thought to have these characteristics and which can possibly radically change this reality of HIV detection.

Keywords: Nanomaterials, nanobiosensors, HIV, AIDS, VIH detection.

I. Introdução

I.1. VIH/SIDA

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é maioritariamente reconhecido por ser o agente causador do Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), doença perante a qual o sistema imunitário fica fragilizado e o organismo fica sujeito a infeções oportunistas. Segundo o Programa das Nações Unidas sobre VIH/SIDA (UNAIDS), esta doença é das mais graves que afeta a saúde, morrendo anualmente cerca de 2,5 milhões de pessoas por VIH/SIDA.^{3,6,11}

I.1.1. Contextualização Histórica

De acordo com o conhecimento atual, a disseminação do VIH começou em meados do século XX, sendo que a transferência para os seres humanos terá sido efetuada a partir do contacto com macacos, há cerca de 35 a 50 anos atrás. No entanto tal, não foi suficientemente confirmado epidemiologicamente. Devido à disseminação, e ao período de incubação da epidemia, admite-se igualmente que esta esteja relacionada com a peste negra, tendo esta última sido causada por um vírus hemorrágico. Foram examinados detalhadamente dados históricos que levaram à conclusão de que a bactéria *Yersenia pestis* era um dos agentes infecciosos na epidemia, junto com outro agente que se julga ser o VIH. As considerações basearam-se principalmente na existência da mutação delta 32 do recetor C-C da quimiocina tipo 5 (CCR5 Δ 32), que protege contra a infeção pelo VIH e está presente na população caucasiana há mais de 2000 anos. A combinação de dois agentes infecciosos levou à devastação causada pela peste negra, à remoção de portadores de VIH e a um aumento no número de mutações CCR5 Δ 32 na população caucasiana. Na África Subsaariana, esta epidemia e o subsequente processo de saneamento não ocorreram, o que explica o nível de informação genética sobre o VIH nesta parte do mundo ser superior. Contudo, tal teoria ainda precisa de melhor comprovação.^{1,2}

A teoria mais comum relata que o VIH ocorreu por transmissão zoonótica do vírus da imunodeficiência símia de chimpanzés *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpz), tanto para o grupo M como para o grupo O do VIH do tipo 1 (VIH-1), por volta de 1920, e para o grupo N de VIH-1 por volta de 1960, na África Central Ocidental. O VIH do tipo 2 (VIH-2) foi transmitido por via zoonótica por macacos (*Cercocebus atys*) em humanos na África Ocidental por volta de 1940. Análises genéticas moleculares sugerem que o VIH-1 foi exportado para o Haiti, provavelmente em 1966, chegando à América do Norte

aproximadamente dois anos depois. Desde meados dos anos 80, os diferentes subtipos de VIH-1 do grupo M espalharam-se e rapidamente se tornaram pandemia global. Em contraste com o VIH-1, o VIH-2 permaneceu inicialmente restrito à África Ocidental, dado apresentar menor infecciosidade. No entanto, posteriormente, o VIH-2 foi exportado para Portugal e França, provavelmente em meados da década de 1960, ocorrendo então uma disseminação do tipo 2 do VIH. A prevalência deste último seria documentada especialmente na Europa, América do Sul e Ásia. Em 2013 foi estimado que, globalmente, 35 milhões de pessoas viviam com VIH. Desde 1999, o número de novas infeções tem diminuído gradualmente. Para 2013, foi estimado um número de 1,9 milhões pessoas recém-infetadas. Cerca de três quartos das pessoas infetadas pelo VIH vivem na África Subsaariana, sendo que dois terços das novas infeções relatadas são originários dessa região. Os países mais afetados pelo VIH, com alta prevalência entre jovens de 15 a 49 anos, são a Suazilândia (aproximadamente 27%), Lesoto (aproximadamente 23%) e Botswana (aproximadamente 23%).^{1,3,4}

Segundo a Direção Geral de Saúde, em Portugal os primeiros casos de infeção por VIH ocorreram em meados do ano de 1983. Ao longo dos últimos 36 anos, assistimos a profundas alterações, tanto na disseminação da doença como na sua forma de propagação e terapêutica, havendo uma evolução muito positiva em termos médicos, sociais e culturais. No entanto, muito permanece por fazer, dado que Portugal continua a ser dos países com uma das mais elevadas taxas de incidência de novos casos de infeção diagnosticados, no contexto da União Europeia.⁵

1.1.2. Características do VIH

A morfologia do VIH é aproximadamente esférica e apresenta um diâmetro de cerca de 120 nm, o que faz com que possa ser visto como uma nanoestrutura biológica. É dos vírus que apresenta maiores variações, devido à taxa de substituição dos nucleótidos ser elevada. O seu material genético apresenta-se na forma de RNA e contém 9 genes que codificam 19 proteínas.⁶⁻⁸ É um lentivírus que pertence à família dos retrovírus e à subfamília *Orthoretrovirinae*. Como anteriormente indicado foram identificados dois tipos, VIH-1 e VIH-2. O tipo VIH-1 (o mais comum e que tem suscitado mais estudos) encontra-se subdividido nos grupos M, N, O e P. Em termos filogenéticos, no grupo N e O dos humanos podem encontrar-se alojados vários vírus relacionados com o chimpanzé; no grupo P, pode encontrar-se o SIV dos gorilas (SIVgor). Relativamente ao grupo M, os vírus são subdivididos pelos subtipos de A à D (que em termos de evolução são os mais antigos), F à H, J e K.^{3,9} O VIH recombinante é derivado de diversos subtipos e é denominado CRF (forma de

recombinação circulante). A recombinação é observada quando uma célula alvo é infetada com pelo menos dois subtipos diferentes de VIH. Por exemplo, quando ocorre a troca de uma sequência de genes completa em posições não específicas. Os anticorpos anti-VIH-1 são gerados após a infecção pelo tipo VIH-1. No entanto, só podem ser detetados geralmente entre as 4-8 semanas, já que a janela de deteção é tardia, dificultando a oportunidade de gerar um diagnóstico precoce. Um dos objetivos dos biossensores desenvolvidos, nomeadamente os baseados em nanomateriais, consiste em arranjar meios para solucionar este problema. De realçar que o tipo VIH-2 não se consegue distinguir do VIH-1 em termos morfológicos, apresentando menor potencial patogénico.^{3,7,10}

O genoma do VIH consiste em duas cadeias simples de RNA idênticas, situadas dentro do núcleo deste vírus. O genoma do provírus do VIH, também conhecido como proviral DNA, é gerado pela transcrição reversa do genoma RNA viral em DNA, ocorrendo seguidamente a degradação do RNA e a integração do DNA de cadeia dupla do VIH no genoma humano. O genoma do DNA do VIH é atacado em ambas as extremidades por sequências de repetição de terminal longa (LTR). Na região 5'LTR vai dar-se a codificação do promotor, para que se inicie a transcrição dos genes virais. A leitura do segmento do gene gag ocorre no sentido 5' para 3' e vai codificando as proteínas do exterior da membrana do núcleo (MA, p17), a proteína do capsídeo (CA, p24), o nucleocapsídeo (NC, p7) e uma proteína estabilizadora do ácido nucleico de menores dimensões. O segmento de leitura do gene gag é seguido pelo segmento de leitura do gene pol para que ocorra a codificação para as enzimas protease (PR, p12), transcriptase reversa (RT, p51) e ribonuclease H (RNase H, p15) ou transcriptase reversa (RT mais RNase H, p66 juntos) e integrase (IN, p32). Adjacente ao gene pol, vem o segmento de leitura de env e a partir dele são derivadas as duas glicoproteínas de envelope: proteína de superfície (gp120, SU) e proteína transmembranar (gp41, TM). Além das proteínas estruturais, o genoma do VIH codifica também para originar várias proteínas reguladoras como a proteína transativadora (Tat) e regulador de *splicing* de RNA (Rev). Estas têm um papel importante para o início da replicação do VIH, enquanto outras proteínas reguladoras como o fator regulador negativo (Nef), fator de infetividade viral (Vif), proteína de vírus r (Vpr) e proteína de vírus única (Vpu) são necessárias na parte da replicação viral, na iniciação do vírus e na patogénese. O VIH-2 codifica a proteína x viral (Vpx) em vez de Vpu, o que acaba por ser parcialmente responsável por este tipo de VIH apresentar uma patogenicidade reduzida comparativamente ao tipo VIH-1. A estrutura do genoma do SIVcpz e do SIVgor é idêntica à do VIH-1.³

I.1.3. Formas de transmissão

Tipicamente, o VIH pode ser transmitido por partilha de fluídos, mormente via sexual (uma vez que se encontra apto a entrar no organismo através de membranas intactas ou de pele e/ou mucosas lesionadas), por partilha de seringas para consumo de drogas e também pela transmissão mãe-filho, tanto no processo do parto como durante a amamentação. No entanto, essa transmissão também pode ocorrer por transplante de órgãos, transmissão de saliva e inseminação artificial, não obstante menos frequentemente, dado o menor número de casos recenseados. O VIH consegue infetar uma variedade de células do sistema imune, tais como as células T CD4⁺, macrófagos e células da microglia.³ Em Portugal, no presente ano, e à semelhança do que se constatou nos anos mais recentes, a transmissão mais frequente com uma percentagem de 60,6% continua a ser a que advém por contacto heterossexual, seguida pela transmissão por relações sexuais entre homens, com uma percentagem de cerca de 36,9%. Esta última é assinalada por um número muito representativo, nomeadamente cerca de 51,4% dos casos de sexo masculino. A transmissão associada ao consumo de drogas por via injetável, que há vários anos atrás se apresentava como a forma mais frequente, é hoje em dia indicada em apenas 1,5% dos casos (Figura 1).⁵

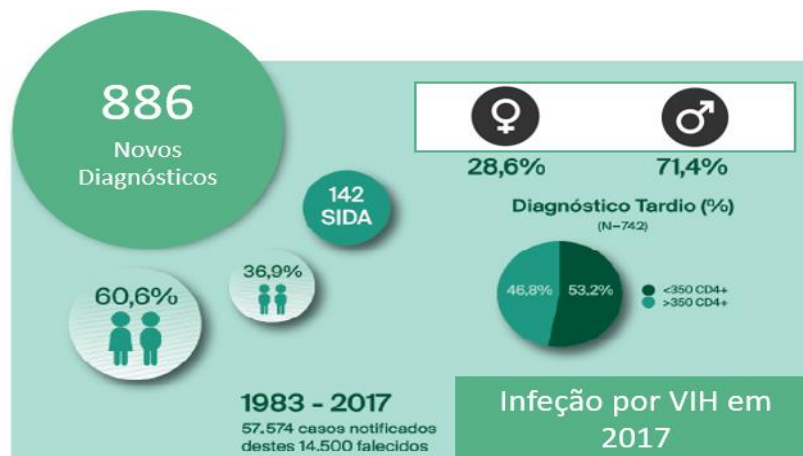


Figura 1. Formas de transmissão do vírus VIH e a Evolução de VIH/SIDA em Portugal no ano 2017 (Adaptada da referência 5).

I.1.4. A importância da deteção precoce da infeção por VIH

A capacidade de deteção precoce da infeção por VIH é deveras importante, tendo em muitos aspetos um papel crítico. Em primeiro lugar, pelo facto de durante a fase aguda o potencial de contágio do vírus ser muito superior que na fase crónica. Detetar a infeção num estágio precoce de desenvolvimento doença permite a redução drástica do contágio, levando à quebra do ciclo de transmissão do vírus. Em segundo lugar, iniciar o tratamento

antirretroviral adequado o mais cedo possível oferece grandes vantagens a longo prazo em termos clínicos, tendo sido provado por vários investigadores que se consegue baixar os riscos relacionados com a doença, e mesmo a transmissão do vírus, até 96%, para além de se melhorar a eficiência da terapia antirretroviral.^{4,7} É aqui que entra a possibilidade de com os nanomateriais se poder atingir este objetivo, tentando também conseguir-se detetar o vírus com menor volume de amostra, maior sensibilidade, rapidez e se possível com menores custos relativamente aos métodos convencionais, como ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), *Imunoblot* de proteínas (*Western Blotting*), etc. Apesar de já serem considerados métodos com boa sensibilidade, apresentam um custo elevado devido às exigências dos materiais necessários requerendo centros avançados de pesquisa e pessoal especializado. Não apresentam igualmente a capacidade de detetar a infeção por VIH em estágio precoce da infeção, devido aos anticorpos VIH apresentarem níveis de concentração muito baixos.^{6,12,13}

2. Nanotecnologia e Nanomateriais

Segundo a *National Nanotechnology Initiative* (NNI), um projeto americano que visa compreender e controlar os materiais a escala nano, a nanotecnologia é ciência, é engenharia e tecnologia, tudo direcionado numa nanoescala.⁷ Os nanomateriais (NMs) derivam da palavra grega *návoç* (anão) e definem-se por apresentarem dimensões muito pequenas da ordem dos nm usualmente abaixo dos 100 nm. A sua definição é, porém, um tema controverso. A Comissão Europeia emitiu em 2011 uma recomendação sobre a definição de NMs, de modo a simplificar tal controvérsia, definindo os nanomateriais como um material natural ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou em forma de agregado/aglomerado. Em termos de distribuição dos nanomateriais por número-tamanho, metade ou mais de metade das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos, os quais se encontram compreendidos numa gama entre 1-100 nm.^{14,15}

Os NMs por apresentarem características únicas e atrativas, conseguem aplicar-se a inúmeras áreas podendo ser preparados e sintetizados por inúmeros métodos descritos mais à frente. Apresentam diversas utilidades e aplicações na área da farmácia, mormente a deteção e diagnóstico de vários alvos, como macromoléculas (proteínas, DNA e RNA), vírus (a exemplo do VIH), e células como bactérias, entre outras aplicações. Uma das principais aplicações destes NMs na área da farmácia é o tratamento e diagnóstico de diversas doenças como o cancro pois podem ser usadas como veículo de transporte de drogas e para

diagnóstico através por exemplo da fluorescência dessas nanopartículas. Além de poderem ser utilizadas como meio de diagnóstico são também utilizadas na cosmética, indústria alimentar, eletrônica, engenharia de máquinas, indústria de construção ou no campo ambiental. Devido à reduzida dimensão das partículas e às modificações que ocorrem ao nível da estrutura destes materiais, conduzindo ao aumento da área de superfície em relação ao volume, isto é, ao aumento do número de moléculas/átomos, conseguem alcançar propriedades de superfície únicas, comparativamente aos materiais com a mesma composição físico-química, mas de maiores dimensões. Isso permite-lhes modificar a reatividade e melhorar as suas propriedades no campo ótico, eletroquímico e mecânico. Devido à descoberta deste tipo de propriedades, têm evidenciado um crescimento e evolução na sua utilização significativos ao longo dos últimos anos.^{7,11,16}

2.1. Biossensores

Tipicamente, os biossensores são dispositivos analíticos, por norma compostos por três componentes: 1. uma fase de reconhecimento seletiva, eventualmente específica, de origem biológica; 2. o transdutor, que converte o sinal de entrada analítico num sinal de saída, e 3. o aparelho de leitura, que envolve o processamento de sinal (normalmente a amplificação do sinal) e exibição do sinal de saída num formato apropriado ao estudo realizado.^{12,17} Estes dispositivos, através do transdutor, transformam o sinal que advém da interação do analito em estudo com o elemento biológico dando origem a um sinal eletroquímico, ótico ou magnético, num outro sinal mensurável normalmente elétrico conseguindo quantificar o biomaterial existente nas amostras.^{12,17}

Com base nos diferentes tipos de sinais analíticos, inúmeros biossensores têm vindo a ser desenvolvidos para deteção de ADN, proteínas ou outros compostos relacionados com o VIH apresentando-se como alternativa aos métodos convencionais. Tendo como base os diferentes tipos de sinais analíticos, os biossensores podem ser categorizados como eletroquímicos, óticos, mecânicos, entre outros.¹⁸

De acordo com os componentes de reconhecimento seletivo, existem três classes de biossensores: biossensores moleculares (baseados em anticorpos, ácidos nucleicos, enzimas ou canais iónicos), biossensores celulares e biossensores teciduais. Quanto aos elementos sensíveis, estes dois últimos são baseados no próprio organismo, enquanto o primeiro se baseia em componentes biológicos imobilizados.¹⁷

Atualmente, devido ao rápido desenvolvimento das nanotecnologias, os biossensores baseados em novos materiais, como os nanomateriais, são desenvolvidos com o intuito de

oferecer resposta sensível às moléculas-alvo, assim como de proverem à deteção de outras moléculas relacionadas. Os biossensores em nanoescala são uma ferramenta poderosa para a análise do microambiente celular, oferecendo a possibilidade de um diagnóstico precoce e de deteção de tecidos e/ou moléculas patogénicos. Como é conhecido, os nanomateriais têm tamanhos que podem variar de alguns nanómetros até várias centenas, o que acaba por equipará-los a muitas macromoléculas biológicas, como plasmídeo de DNA, anticorpos, enzimas e vírus. Materiais que se encontram nesta escala de tamanho exibem propriedades físicas interessantes, distintas da escala molecular e de outras superiores, suscitando novas oportunidades para pesquisa e aplicações biomédicas. O campo emergente da nanobiotecnologia une a física à biologia por meio de métodos químicos no desenvolvimento de novas ferramentas e plataformas para o entendimento de sistemas biológicos, diagnóstico e tratamento de doenças. As macromoléculas biológicas acima mencionadas são geralmente biomarcadores, indicadores de um estado ou condição biológica.^{12,17}

Em especial, o biomarcador da doença (isto é, proteínas e fragmentos de proteína, o DNA/RNA, ou pequenas moléculas específicas secretadas por células anormais) é uma "assinatura molecular" do estado fisiológico da doença num momento específico e, portanto, uma chave para a deteção precoce e o diagnóstico preciso da doença. Os biomarcadores de doenças também oferecem informações sobre o mecanismo subjacente da iniciação de uma doença e, em última análise, fornecem ferramentas poderosas para definir com precisão os estados de doença, ajudando a que se consiga tratar num estágio precoce, o que potencia a probabilidade de sucesso e melhor qualidade de vida.^{12,17}

Desta forma, o desenvolvimento de biossensores para biomarcadores de doenças é essencial para detetar genes, proteínas aberrantes ou vírus que se encontrem em níveis ultrabaixos, já que muitos biomarcadores estão presentes em concentrações mínimas durante as fases iniciais da doença. Enquanto isso, pretende-se conseguir dos biossensores que se encontram na escala nano uma apresentação mais portátil e maior facilidade de alteração de escala, sempre que necessário para análise de amostras no local de atendimento próximo do utente de saúde "*point of care*", fornecendo simultaneamente um diagnóstico em tempo real.^{12,17}

Na presente monografia, será discutida a literatura publicada nos últimos anos sobre os avanços em biossensores para aplicações biomédicas, mais especificamente para a deteção da infeção causada pelo vírus VIH num estágio precoce. Esta discussão será dividida em duas partes principais correspondendo a primeira parte ao desenvolvimento de biossensores óticos, a qual merecerá o maior enfoque e a segunda ao desenvolvimento de biossensores eletroquímicos.

2.1.1. Biossensores Óticos

A identificação e quantificação de numerosos biomarcadores são necessárias para diagnosticar, monitorizar e efetuar uma avaliação prognóstica de doenças complexas como a SIDA, causada pelo VIH. A infeção por VIH representa um problema de saúde pública na Europa e em Portugal. Na Europa, estima-se que cerca de 15% das pessoas que vivem com VIH não se encontram diagnosticadas. Ou seja, uma em cada sete pessoas não tem o conhecimento de que está infetada. Em Portugal, estima-se que esse valor tenha uma percentagem inferior a 10%.¹⁹ O desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico eficaz para detetar essas células tem sido difícil, devido ao baixo número de anticorpos anti-VIH na fase inicial após a infeção. Como já anteriormente indicado geralmente, a janela de deteção situa-se entre as 4-8 semanas.¹⁰ No entanto, aplicações *in vivo* e *in vitro* de nano biossensores baseados em nano-interfaces ou nanoestruturas inteligentes podem ser usadas para aumentar a seletividade e resolução, tornando tais diagnósticos possíveis.

Biossensores baseados nos diferentes tipos de materiais funcionalizados têm emergido ultimamente nos diferentes campos da biomedicina. Em especial, biossensores baseados na medição de um sinal ótico, biossensores óticos, são a classe de biossensores mais diversa, pois podem ter como base diversos tipos de espectroscopia nomeadamente fluorescência, ressonância plasmónica de superfície (SPR), dispersão de Raman amplificada por superfície (SERS), ultravioleta-visível, fosforescência, espectrometria de refração e dispersão. Os biossensores baseados na fluorescência, SPR e SERS serão aqueles que abordaremos nesta monografia. Esses métodos espectroscópicos podem aliás medir propriedades diferentes, como a energia, polarização, amplitude, tempo de decaimento e/ou fase. A amplitude é a medida mais comum, pois facilmente permite realizar a deteção do analito específico e quantificá-lo.^{6,12,17}

Em suma, a deteção ótica é um método que usa biossensores para a sua deteção e quantificação dos analitos ou células em estudos *in vitro* ou *in vivo*. Comparativamente aos biossensores eletroquímicos, os biossensores óticos têm muitas vantagens, como a de não serem invasivos, a capacidade de detetarem múltiplos alvos, a possibilidade do rastreamento ativo de analitos ou células *in vitro/in vivo*, e assim por adiante. Na Figura 2 é apresentada a representação esquemática de biossensores óticos baseados em Fluorescência, em SPR e SERS.^{7,20}

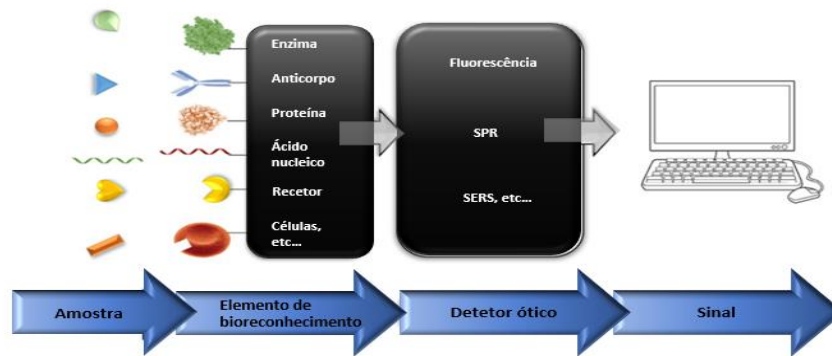


Figura 2. Biossensores óticos (baseada na referência 14)

Fluorescência

Entre outras opções, a detecção por fluorescência é uma das metodologias mais utilizadas, devido às vantagens da alta sensibilidade, seletividade e simplicidade. No biossensor baseado em fluorescência, são aplicados marcadores fluorescentes como por exemplo, pontos quânticos (*quantum dots*, QDs), nanopartículas de ouro (AuNPs) ou nanobastões (*nanorods*, NRs), que emitem a luz a uma frequência menor do que a luz no seu estado de excitação.^{7,21}

Um ensaio ultrasensível baseado em NPs é um ensaio de amplificação por bio código de barras (*biobarcode assay*, BCA), que utiliza oligonucleótidos e sondas de NPs. Os bio código de barras apresentam grande potencial em nanotecnologia e têm permitido o desenvolvimento de sensores, devido às suas características como o tamanho pequeno e a capacidade de ligação. O sinal ótico é amplificado através de um processo de amplificação por NPs de prata para aumento de sinais e maior sensibilidade na leitura ótica. O ensaio, em certas condições, permite detetar proteínas como o antígeno específico da próstata (PSA), com um limite de detecção (LOD) de 30 attomolar (aM, 10^{-18} mol/dm³), ou alvos de ácido nucleico, a um nível de 500 zeptomolar (zM, 10^{-21} mol/dm³). Este teste ultrasensível baseado em NPs poderia fornecer uma alternativa mais sensível para a detecção do antígeno da cápside VIH-I (p24), em comparação aos sistemas baseados em ELISA. Posteriormente, houve ensaios onde se modificou este ensaio BCA baseado em NPs para a detecção do antígeno da cápside VIH-I (p24), utilizando microplacas revestidas com anticorpo anti-p24 para capturar o antígeno vírico (p24). Assim, a estreptavidina revestida por uma NP à base de bio código de barras (oligonucleótido) de DNA é usada para amplificação de sinal, seguido por detecção usando um método de scan baseado num *chip*. Este ensaio é 150 vezes

mais sensível e deteta o antígeno p24 do VIH-I três dias mais cedo do que o método de ELISA convencional podendo ser concluído dentro de 2 a 3 horas. No entanto, esta estratégia tem algumas desvantagens. Designadamente, o facto de os oligonucleótidos precisarem de ser modificados com corante (os corantes orgânicos são sensíveis ao fotobranqueamento e alguns deles apresentam um fundo fluorescente significativo, o que faz decrescer a sensibilidade do método) e às vezes com um supressor, o que torna todo este processo complicado e dispendioso.^{7,21}

Esferas magnéticas (MBs) conjugadas com anticorpos monoclonais como o gp120MAbs (gp120MAbs-MBs) foram aplicados para isolar partículas de VIH-I, enquanto esferas poliméricas nanométricas fluorescentes (FNBs) conjugadas com gp120MAbs (gp120MAbs-FNBs) foram usados para obter sinais de fluorescência. A adição de gp120MAbs-FNBs e gp120MAbs-MBs na presença de VIH-I leva à formação de um complexo de partículas MBs-VIH-I-FNB, que pode ser facilmente isolado e concentrado por separação magnética comum. Os resultados mostraram que as esferas conjugadas de anticorpos do VIH-I neutralizantes podem ser empregues para a deteção específica, quantitativa e rápida (menos de 1,5h) de partículas de VIH-I com um baixo volume de amostra (inferior a 100 mL) e sem qualquer pré-tratamento de amostras (Figura 3).²²

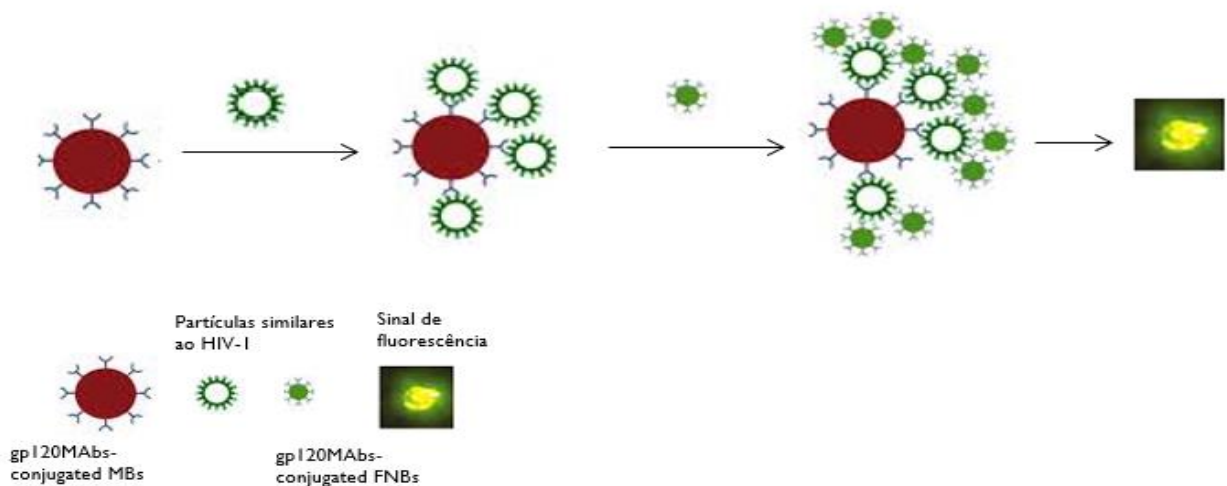


Figura 3. Deteção de partículas gp120 de VIH por aplicação de microesferas conjugadas com anticorpos. (Adaptada da referência 7).

A análise de imagem através da classificação de células ativadas por fluorescência (FACS) revelou a deteção específica e quantitativa de partículas de VIH-I. Estes resultados fornecem a prova de princípio de que amplamente os anticorpos de gp120 neutralizantes do VIH-I acoplados a nano-esferas podem ser empregues na deteção direta de partículas de VIH-I com implicação potencial para o desenvolvimento de sistemas de diagnósticos específicos e rápidos.²²

Outro método baseia-se em tiras de teste. As tiras de teste imunocromatográficas com utilização de ouro coloidal são uma tecnologia bem estudada e aplicável. No entanto, os pontos quânticos (*quantum dots*, QDs) são diferentes das nanopartículas de ouro convencional, por possuir maior área de superfície específica e melhor biocompatibilidade.²³ As propriedades optoelectrónicas únicas apresentadas pelos QDs dão-lhes vantagem sobre os corantes orgânicos tradicionais, não apenas no papel de etiquetas fluorescentes para bioimagem, mas também como sondas emissivas.²⁴ Os QDs, enquanto novas NPs fluorescentes, conseguem agregar um maior número de biomoléculas, com esta capacidade aumentando a sensibilidade e a precisão das tiras. Os QDs possuem várias propriedades distintas para o ensaio de fluxo lateral. Nomeadamente terem um tamanho menor e controlável (2–20 nm), que permite alterar as condições de reação e passar pela faixa com maior facilidade e rapidez. Demonstram também um tempo de vida de fluorescência maior e boa foto-estabilidade. Por todas estas características, afiguram-se excelentes para ensaios de deteção. O facto de apresentarem maior razão área-volume, leva-os a ter mais sítios de ligação, excelente compatibilidade biológica e estabilidade, fazendo com que se combinem melhor e com maior facilidade com biomoléculas. Resumindo, um conjunto diverso de investigadores desenvolveu um tipo de tiras de Ensaio de Fluxo Lateral (LFA) fluorescentes económicas e portáteis, baseadas na amplificação não enzimática mediada por *Toehold*, tornando possível dispensar instrumentos sofisticados e caros de deteção e precisão, assim como técnicos especialistas para o fazer. Após a síntese do CdTe-H2 o DNA do VIH ligou-se ao CdTe formando-se CdTe-dsDNA. O CdTe-dsDNA formado liga-se à tira de teste, melhorando assim o sinal do teste. O limite de deteção (LOD) destas tiras é de 0,76 pM, com grande seletividade, reprodutibilidade e estabilidade. O método proposto apresenta potencial para deteção clínica, utilizando soro humano. Acima de tudo, as tiras de teste fluorescentes combinadas com a amplificação de sinal atuam concomitantemente como uma medida de deteção para o diagnóstico precoce da SIDA.²³

Ressonância plasmónica de superfície (SPR)

O biossensor pode realizar uma bioanálise eficiente, específica e rápida de vírus por diversas técnicas baseadas em nanoestruturas e uma delas é a SPR.¹⁷ A técnica de SPR é um método ótico que mede o índice de refração de camadas muito finas de material adsorvido num metal (a interface metal/dielétrico ou metal/vácuo), constituindo uma poderosa ferramenta analítica devido às suas vantagens de monitorização e análise estável em tempo real.¹⁸ Devido às suas características, os biossensores óticos baseados em SPR estão a ter

uma grande aplicação, tanto tendo como base uma ampla variedade de interações entre macromoléculas, como na definição de alta ou baixa afinidade da interação entre pequenas moléculas e na análise da interação biomolecular em tempo real (por exemplo, anticorpo-antígeno, ligante-recetor, DNA-DNA, DNA-proteína, proteína lipídica e biomoléculas complexas) sem requisitos de funcionalização.⁷ O sinal de resposta do SPR está relacionado com a quantidade das moléculas ligadas à superfície do *chip*. Até agora, vários ensaios de SPR empregaram estratégias de amplificação de sinal baseadas em enzimas ou nanomateriais metálicos para melhorar a sensibilidade.¹⁸ Resumidamente, esta técnica é aplicada para ligar NPs às superfícies alvo e, em seguida, analisar a mudança do sinal por SPR usando microscopia SPR.⁷

As AuNPs revestidas com múltiplas cópias de ligantes de sulfato na extremidade, passam a atuar como agentes anti-VIH. São capazes de se ligar à glicoproteína gp120 do envelope do VIH (a ligação será avaliada pela ressonância de plasma de superfície) e de inibir *in vitro* a infecção pelo VIH das células T em concentrações nanomolares.²⁵ Também foi demonstrado que uma densidade de 50% de ligantes sulfatados em AuNPs com um tamanho de aproximadamente 2 nm é suficiente para alcançar grandes atividades anti-VIH. Cientistas conseguiram que ocorresse a detecção ótica em tempo real de AuNPs soltas em superfícies usando microscopia SPR. A técnica explora as reflexões alteradas localmente a partir de uma superfície SPR causada por AuNPs ligados a partículas soltas do tipo VIH (com diâmetros de aproximadamente de 100 nm). Uma razão sinal-ruído de aproximadamente 4 foi obtida com partículas de poliestireno de 40 nm.⁷

Noutro estudo, foi desenvolvido um método ótico de genossensibilização sem marcadores, implementando nanobastões de ouro (AuNRs) anisotrópicos carregados positivamente e um ADN com sonda livre de marcadores num tampão com grande força iónica para a detecção de sequências específicas de ADN de VIH. Quando o alvo de ADN é adicionado, se os AuNRs se agregarem, vai ocorrer uma mudança de cor, de vermelho para roxo claro, o que resulta numa forte dispersão de luz medida por dispersão de luz por ressonância plasmónica (PRLS) a 555 nm. As medições efetuadas aumentam linearmente com o aumento da concentração do alvo de ADN. Neste método, um LOD de 80 pM foi alcançado para o segmento de LTR do VIH-I U5 e a detecção pode ser concluída em menos de 5 min.⁷

Dispersão de Raman amplificada por superfície (SERS)

Outra tendência na área de sensores é o desenvolvimento de sensores baseados em SERS funcionando o espectro molecular como impressão digital, que depende da intensidade de espelhamento Raman das moléculas, o qual aumenta significativamente após a adsorção numa superfície de metal.¹² Os biossensores baseados em SERS aplicam intensificação a dispersão de Raman através de moléculas adsorvidas em superfícies de metal (por exemplo, AuNPs ou nano partículas de Ag) ou por nanoestruturas (por exemplo AuNRs).⁷ Entre as diferentes técnicas espectroscópicas que caracterizam o campo eletromagnético resultante da ressonância plasmônica de AuNPs (superfície intensificada por fluorescência, superfície intensificada por absorção e superfície intensificada por dispersão de Raman), a SERS é a mais apelativa, devido ao aumento do sinal que permite, por um fator de cerca de 10^{14} – 10^{15} , melhorar o LOD de conjuntos de moléculas para o nível de molécula singular, e assim alcançar sensibilidade comparável à fluorescência.²⁶

As AuNPs têm sido amplamente utilizadas no campo da detecção de vírus, dadas as propriedades óticas/elétricas únicas que evidenciam. Num determinado estudo conseguiu-se detetar a sequência de DNA viral do tipo VIH-I com uma sensibilidade de cerca de 100 pmol/L, aproveitando propriedades óticas não-lineares de segunda ordem de AuNRs.²⁷ As técnicas baseadas na dispersão de Raman são técnicas analíticas muito poderosas, utilizadas para análise química e biológica, e fornecem informações sobre estruturas moleculares, processos de superfície e reações de interface. A SERS normalmente não é tão poderosa em moléculas que não se encontrem localizadas na superfície de nanopartículas de metal, porque a luz visível que não é absorvida por estas moléculas vai ser apenas dispersa com pouca intensidade fora das vibrações moleculares. A regra de seleção para espectroscopia Raman é a polaridade que vai mudando ao longo da vibração, a qual geralmente fornece apenas um sinal ativo fraco na concentração de níveis usuais.²⁶

Enquanto que os espectros de fluorescência são espectros de bandas largas (tipicamente 50-100 nm, a meia altura da banda) e acontece facilmente a sobreposição espectral, os espectros Raman do mesmo composto apresentam bandas mais estreitas (inferior a 1 nm, a meia altura da banda). Os espectros de Raman, fornecem informação estrutural de uma molécula e são uma ferramenta ideal para a genotipagem molecular devido à sua seletividade associada às linhas de emissão estreita e às bandas vibracionais específicas da molécula.²⁶ No entanto, a seção transversal obtida por espectroscopia de Raman não é tão intensa e não permite a obtenção de limites de detecção tão baixos. A SERS foi observada pela primeira vez em 1974. Esta técnica intensifica o sinal obtido por dispersão Raman para moléculas

adsorvidas especialmente em superfícies metálicas nanoestruturadas e NPs. A velocidade, seletividade e relativa facilidade de implementação da técnica SERS é uma alternativa muito importante para as ferramentas e metodologias de diagnóstico viral atuais.^{7,20}

Posteriormente, foi demonstrado que um sensor baseado em plasma pode detetar sequências de ácido nucleico do gene gag do tipo VIH-1. Este ensaio envolve um nano sensor, consistindo em um *hairpin loop* de ADN com uma molécula que dá origem a dispersão de Raman numa extremidade e NPs de Ag na extremidade oposta. O sinal SERS é observado quando o sensor designado por sentinela molecular (MS) está na conformação *hairpin* (estado fechado). Contudo, quando esta apresenta-se no seu estado aberto, o sinal é menor. Neste ensaio foram utilizados coloides de Ag com um diâmetro que se situava entre 35–50 nm e apresentando uma absorção máxima a 390 nm. Estima-se que a eficiência de supressão de SERS seja de 75% após a hibridização do nano sensor MS de plasma à sequência alvo do ADN do tipo VIH-1.⁷

Outro método combina NPs magnéticas funcionalizadas com Ag/SiO₂ com os oligonucleótidos como sensor de Raman. Neste método as NPs magnéticas revestidas de sílica com o grupo amino (vão funcionar como cadeias de captura como matriz de imobilização), e em conjunto tem inserido uma ferramenta de separação para deteção de sequências de ADN relacionado ao VIH. As nanopartículas Ag/SiO₂ exibem uma forte intensidade de SERS, e as cápsulas de sílica em torno dos núcleos de prata permitem que as etiquetas Raman exibam uma forma de atuar extraordinária e fácil (observou-se que os núcleos de prata com uma dimensão de 23 +/-1 nm são encapsulados por um revestimento de sílica com 12 +/-1). Assim, as NPs magnéticas possuem vantagens, tais como a fácil separação e amplificação de sinal. Tudo isto é possível porque a separação magnética não só diminui a perda de amostra e reação inespecífica na maior extensão durante a lavagem, mas também concentra a hibridização do produto final, levando ao aumento do sinal Raman. O tempo ideal de hibridização é de 60 min.

Dispersão de hyper-Rayleigh (HRS)

Num estudo, monitorizado usando a técnica de dispersão de hyper-Rayleigh (HRS), foram relatadas propriedades óticas não lineares de segunda ordem extremamente altas. Este ensaio é utilizado para a deteção do gene gag de cadeia simples do DNA do HIV com excelente sensibilidade (100 pM) e seletividade (incompatibilidade de par de bases único). Quando um 145-mer isento de marcadores sofreu hibridização com 100 pM de ADN alvo, observou-se uma alteração colorimétrica clara devido à agregação (alterações máximas de

absorção de 697 a 950 nm) e a intensidade HRS aumentou 45 vezes, facilitando assim a detecção dos vírus e economizando tempo.^{7,28}

Tabela I. Alguns estudos baseados nos métodos de detecção eletroquímicos abordados anteriormente (Com base nas referências 7, 20 e 28).

Método de detecção ótico	Nanomateriais	Alvos	Tempo de detecção	Limites de detecção
Fluorescência	A estreptavidina revestida por uma NP à base de bio código de barras (oligonucleótido) de DNA	Antígeno da cápside VIH-1 (p24)	Pode ser concluído dentro de 2 a 3 horas	/
Fluorescência	Adição de gp120MAbs–FNBs e gp120MAbs–MBs	Isolar partículas de VIH-1	Quantitativa e rápida (menos de 1,5h)	/
Fluorescência	Tiras de Ensaio de Fluxo Lateral (LFA) fluorescentes com Pontos Quânticos (QDs), como CdTe-H2	DNA do VIH	/	0,76 pM
SPR	AuNPs revestidas com múltiplas cópias de ligantes de sulfato na extremidade	Glicoproteína gp120 do envelope do VIH	/	/
SPR	Nanobastões de ouro (AuNRs) anisotrópicos carregados positivamente e um ADN com sonda livre de marcadores	Sequências específicas de ADN de VIH	/	80pM
SERS	AuNPs	Sequência de DNA viral do tipo VIH-1	/	100 pmol/L
SERS	NPs magnéticas revestidas de sílica com o grupo amino	Sequências de DNA relacionado ao VIH.	60min	/
HRS	NPs magnéticas	Gene gag de cadeia simples do DNA do HIV	/	100 pM

2.2.2. Biossensores eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos podem ser usados também na detecção de ácidos nucleicos. Devido ao uso de compostos electroquimicamente ativos, a detecção eletroquímica pode ser considerada como uma das ferramentas mais sensíveis para a detecção de ácidos nucleicos.²⁹ Existem inúmeros biossensores eletroquímicos, que são

desenvolvidos com o intuito de serem aptos para detecção de determinadas moléculas alvo. Existem vários métodos de detecção eletroquímica, como a voltametria cíclica (CV), a voltametria de onda quadrada (SWV), a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS), a voltametria de impulso diferencial (DPV), e ainda um método híbrido.¹¹

Voltametria cíclica (CV)

A voltametria reporta-se a uma técnica eletroquímica na qual, a partir do registo de curvas de intensidade de corrente em função do potencial, se consegue obter informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química, feitas durante a eletrólise dessa espécie numa célula eletroquímica. Célula essa que terá na sua constituição pelo menos dois elétrodos: um referido como o eléctrodo de trabalho e o outro como o de referência. O mecanismo consiste num varrimento de potencial aplicado entre estes dois elétrodos. Por outras palavras, é um potencial que vai variando com uma velocidade constante em função do tempo. Tanto o potencial como a corrente resultante do processo são registados em simultâneo. No final é obtido um voltamograma com os dados da intensidade de corrente e do potencial.^{30,31}

A voltametria cíclica apresenta-se como um tipo de medição eletroquímica em que o potencial do eléctrodo de trabalho vai aumentado numa relação linear com o tempo. Um voltamograma cíclico é desenhado com a corrente do eléctrodo de trabalho em relação à voltagem aplicada. Este tipo de voltametria é comumente aplicada para fins de detecção e de caracterização das propriedades eletroquímicas de um analito em solução.¹¹

Voltametria de onda quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada de varrimento rápido apresenta uma vantagem relativamente ao método DPV, que é o facto de permitir a realização de experiências com uma maior rapidez. Todavia, a componente da sensibilidade é bastante semelhante entre as duas técnicas. Uma experiência típica que geralmente demora cerca de três minutos para ser realizada pela DPV, na SWV pode realizar-se em segundos.³² No método SWV, a corrente no eléctrodo de trabalho é medida, enquanto que o potencial entre um eléctrodo de referência e o eléctrodo de trabalho é varrido linearmente em relação ao tempo.¹¹

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS)

Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) ou a impedância de Corrente Alternada (AC) é uma técnica sensível que, no sistema estudado, monitoriza a resposta

elétrica após a aplicação de um sinal de corrente alternada periódico e de pequena amplitude. Neste método, a resposta do sistema fornece informações sobre o estado da interface (presença de substância ou analito adsorvido) e pode detetar a ocorrência de reações de interface. Devido ao uso de rótulos electroquimicamente ativos, os métodos de deteção baseados em eletroquímica podem ser considerados como uma das ferramentas mais sensíveis para a deteção de enzimas, anticorpos e ácidos nucleicos. Um arranjo de biossensores eletroquímicos tem muitas vantagens, como por exemplo apresentar um baixo LOD, baixo custo e simplicidade, devido à facilidade de obtenção de sinal elétrico. EIS como as parcelas de *Nyquist* foram relatadas como um método eficaz para monitorizar as características da superfície e, assim, permitir uma compreensão da transformação química e processos associados à superfície condutora do eléctrodo em diferentes etapas de modificação¹¹

Voltametria de impulso diferencial (DPV)

A DPV é das técnicas de voltametria mais usadas para fins analíticos, devido às vantagens que apresenta. Uma delas é a resolução superior em relação a outras técnicas que utilizam uma corrente contínua.^{31,32} Este tipo de método é sensível e extremamente seletivo na medição de vestígios e nas determinação de analitos. Na DPV, o potencial é varrido com uma série de pulsos.¹¹

Método Híbrido

No método híbrido, utilizam-se 2 ou mais métodos eletroquímicos, referidos anteriormente, para a deteção de analitos.¹¹

Na Tabela 2 encontram-se alguns exemplos de estudos relativamente aos métodos de deteção eletroquímicos acima referidos.

Tabela 2. Alguns estudos baseados nos métodos de detecção eletroquímicos abordados anteriormente (Com base na referência 11).

Método de detecção eletroquímico	Nanomateriais	Alvos	Parâmetros	Limite de detecção
CV	AuNPs	HIV gp 120	Potencial de scanning: -200 mV a 800 mV Potencial: 5 mV	600 fg/mL
CV	NPs magnéticas	Sequência de ADN de HIV	Potencial de scanning: -600 mV a 600 mV Frequência: 100 mHz a 100 kHz Potencial: -300 mV	160 pM
SWV	Eléttodos impressos em tela baseados em nanotubos de carbono	Sequência de ADN de HIV	Potencial: 5 mV	0.1 pg/L
EIS	AuNRs	Deferiprona (medicamento de replicação anti-HIV)	Frequência: 0.01 Hz a 10 kHz Potencial: 0.0 a + 1.75 V Scan: 100 mVs	5 nM
DPV	Nanoestruturas de DNA autoconstruídas	Sequência de ADN de HIV	Potencial: 200 mV a -600 mV Scan: 100 mV/s	5.0 aM
Método Híbrido (EIS-CV)	Compósito de nanopartículas Au-Ag	Sequência de ADN de HIV	Frequência: 10 a 10 ⁵ Hz Amplitude: 5 mV	0.5 pM
CV SWV EIS	Eléttrodo de carbono impresso em tela com função AuNPs	Transcriptase Reversa (RT) do HIV-1	Scan: 100 mV/s Potencial (CV): 100 mV a 350 mV Potencial (SWV): 100 mV a 300 mV Amplitude (SWV): 25 mV Frequência (SWV): 10 Hz Frequência (EIS): 100 kHz a 0.1 Hz	0,8 pg/mL (0.7 fM)

3. Conclusão

A população humana é globalmente ameaçada por pandemias expansivas causadas por vírus, como o vírus da imunodeficiência humana, sendo as possibilidades de diagnóstico atuais relativamente limitadas.²⁹ No entanto, este domínio tem vindo a sofrer grande evolução, havendo atualmente várias nanotecnologias em estudo como base de métodos de diagnóstico ótico para deteção de VIH tais como os biossensores baseados na fluorescência, no SRP e no SERS. Além dos métodos de diagnóstico ótico, existem os métodos eletroquímicos, como a voltametria cíclica, a voltametria de onda quadrada, a espectroscopia de impedância eletroquímica, a Voltametria de pulso diferencial e o método híbrido. Em cada método, vários exemplos de experiências e desenvolvimentos foram abordados, especificando-se as respetivas vantagens, desvantagens e limites de deteção. De uma forma geral, os métodos óticos para desenvolvimento de biossensores apresentam várias vantagens. São métodos não invasivos, permitem a deteção de múltiplos alvos e o rastreamento de analitos ou de células *in vitro/in vivo*. Relativamente aos métodos eletroquímicos, estes ganham ao utilizar instrumentos pouco dispendiosos, conseguindo atingir limites de deteção muito baixos com a simplicidade de obtenção de um sinal eletroquímico.^{7,11} Neste sentido, ambos os métodos têm pontos positivos muito relevantes na deteção do vírus VIH, embora ao longo desta monografia a deteção ótica tenha um maior destaque, por mostrar que futuramente, com o desenvolvimento de novos dispositivos e materiais que a nanotecnologia oferece, ocorrerá provavelmente uma nova revolução na deteção de doenças incuráveis, como VIH/SIDA. Estes desenvolvimentos baseados em nanotecnologia passam pela disponibilidade de uma deteção sensível e específica, bem como pela possibilidade de obtenção de métodos melhorados para identificar o VIH-I usando nanobiossensores óticos, associados à prevenção da transmissão sexual do VIH no início de infeção, com uma sensibilidade aumentada e a possibilidade de se desenhar novos sistemas de deteção de *chip*, a qual apenas é possível com os métodos de deteção ótica.^{7,11}

Bibliografia

1. ZAJAC, V. Evolutionary view of the AIDS process. *J. Int. Med. Res.* (2018) 030006051878691 doi:10.1177/0300060518786919
2. SARAVANAN, M., ASMALASH, T., GEBREKIDAN, A., GEBREEGZIABIHER, D., ARAYA, T., HILEKIROS, H., BARABADI, H. and RAMANATHAN, K. Nano-Medicine as a Newly Emerging Approach to Combat Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Pharm. Nanotechnol.* **6**, (2018) 17–27.
3. ADVISORY, G., BLOOD, C., BLUT, A. and ASSESSMENT, S. Human Immunodeficiency Virus (HIV). (2016) 203–222 doi:10.1159/000445852
4. KAMINSKI, R., CHEN, Y., FISCHER, T., TEDALDI, E., NAPOLI, A., ZHANG, Y., KARN, J., HU, W. and KHALILI, K. Elimination of HIV-1 Genomes from Human T-lymphoid Cells by CRISPR / Cas9 Gene Editing. *Nat. Publ. Gr.* (2016) 1–15 doi:10.1038/srep22555
5. ISABEL ALDIR, HELENA CORTES MARTINS, JOANA BETTENCOURT, T. DE M. Desafios e Estratégias. (2018).
6. PASHCHENKO, O., SHELBY, T., BANERJEE, T. and SANTRA, S. A comparison of optical, electrochemical, magnetic, and colorimetric point-of-care biosensors for infectious disease diagnosis. *ACS Infect. Dis.* (2018) doi:10.1021/acsinfecdis.8b00023
7. VALIZADEH, A. Nanomaterials and Optical Diagnosis of HIV. (2015) 1–8 doi:10.3109/21691401.2015.1052469
8. LIU, Y. and CHEN, C. Role of nanotechnology in HIV/AIDS vaccine development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **103**, (2016) 76–89.
9. ROGERS, L., OBASA, A. E., JACOBS, G. B., SARAFIANOS, S. G., SÖNNERBERG, A., NEOGI, U. and SINGH, K. Structural implications of genotypic variations in HIV-1 integrase from diverse subtypes. *Front. Microbiol.* **9**, (2018) 1–9.
10. ZHOU, J., GAN, N., LI, T., HU, F., LI, X., WANG, L. and ZHENG, L. A cost-effective sandwich electrochemiluminescence immunosensor for ultrasensitive detection of HIV-1 antibody using magnetic molecularly imprinted polymers as capture probes. *Biosens. Bioelectron.* **54**, (2014) 199–206.
11. VALIZADEH, A., SOHRABI, N. and BADRZADEH, F. Electrochemical detection of HIV-1 by nanomaterials. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* **0**, (2017) 000
12. SADEGHI, A. S., ANSARI, N., RAMEZANI, M., ABNOUS, K., MOHSENZADEH, M., TAGHDISI, S. M. and ALIBOLANDI, M. Optical and electrochemical aptasensors for the detection of amphenicols. *Biosens. Bioelectron.* **118**, (2018) 137–152.
13. KOSAKA, P. M., PINI, V. and TAMAYO, J. Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen by

- a hybrid nanomechanical-optoplasmonic platform with potential for detecting HIV-1 at first week after infection. (2017) 1–13 doi:10.1371/journal.pone.0171899
14. LOURO, H., BORGES, T. and SILVA, M. J. Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública. *Rev. Port. Saude Publica* **31**, (2013) 145–157.
 15. GIGAULT, J., HALLE, A. TER, BAUDRIMONT, M., PASCAL, P. Y., GAUFFRE, F., PHI, T. L., EL HADRI, H., GRASSL, B. and REYNAUD, S. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environ. Pollut.* **235**, (2018) 1030–1034.
 16. PROKOPEC, V. and SVECOV, M. *Analytica Chimica Acta* The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures : A review sk a. **1031**, (2018).
 17. BABA, Y., ALIYU, A., ZHAO, Y., YAN, W. and YEUNG, H. Accepted Manuscript. (2018) doi:10.1016/j.petrol.2017.12.071.This
 18. DIAO, W., TANG, M., DING, S., LI, X., CHENG, W., MO, F., YAN, X., MA, H. and YAN, Y. Highly sensitive surface plasmon resonance biosensor for the detection of HIV-related DNA based on dynamic and structural DNA nanodevices. *Biosens. Bioelectron.* **100**, (2018) 228–234.
 19. FARIA, P. DE, NÚNCIO, L., ESTADO, A. S. DE, LEONOR, M. and BARREIROS, D. S. Gabinetes do Secretário de Estado dos Assuntos. (2014) 26369
 20. DAMBORSKY, P., VITEL, J. and KATRLIK, J. Optical biosensors. *Essays Biochem.* **60**, (2016) 91–100.
 21. YE, Y. D., XIA, L., XU, D. D., XING, X. J., PANG, D. W. and TANG, H. W. DNA-stabilized silver nanoclusters and carbon nanoparticles oxide: A sensitive platform for label-free fluorescence turn-on detection of HIV-DNA sequences. *Biosens. Bioelectron.* **85**, (2016) 837–843.
 22. KIM, B. C., JU, M. K., DAN-CHIN-YU, A. and SOMMER, P. Quantitative detection of HIV-1 particles using HIV-1 neutralizing antibody-conjugated beads. *Anal. Chem.* **81**, (2009) 2388–2393.
 23. DENG, X., WANG, C., GAO, Y., LI, J., WEN, W., ZHANG, X. and WANG, S. Applying strand displacement amplification to quantum dots-based fluorescent lateral flow assay strips for HIV-DNA detection. *Biosens. Bioelectron.* **105**, (2018) 211–217.
 24. SHAMIRIAN, A., GHAI, A. and SNEE, P. T. QD-Based FRET Probes at a Glance. (2015) 13028–13051 doi:10.3390/s150613028
 25. DI GIANVINCENZO, P., MARRADI, M., MARTÍNEZ-ÁVILA, O. M., BEDOYA, L. M., ALCAMÍ, J. and PENADÉS, S. Gold nanoparticles capped with sulfate-ended ligands as anti-HIV agents. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **20**, (2010) 2718–2721.

26. GALE, P. 2009 Themed issue dedicated to Professor Jean-Pierre Sauvage. (2009) doi:10.1039/b806051g
27. MOKHTARZADEH, A., EIVAZZADEH-KEIHAN, R., PASHAZADEH, P., HEJAZI, M., GHARAATIFAR, N., HASANZADEH, M., BARADARAN, B. and DE LA GUARDIA, M. Nanomaterial-based biosensors for detection of pathogenic virus. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **97**, (2017) 445–457.
28. DARBHA, G. K., RAI, U. S., SINGH, A. K. and RAY, P. C. Gold-nanorod-based sensing of sequence specific HIV-1 virus DNA by using hyper-rayleigh scattering spectroscopy. *Chem. - A Eur. J.* **14**, (2008) 3896–3903.
29. ADAM, V., HUSKA, D., HUBALEK, J., KIZEK, R. and BRNO, P. S. paramagnetic microparticles and carbon nanotubes-based screen-printed Easy to use and rapid isolation and detection of a viral nucleic acid by using paramagnetic microparticles and carbon nanotubes-based screen-printed electrodes. (2014) doi:10.1007/s10404-009-0464-z
30. BUCHER, E. S., BROOKS, K., VERBER, M. D., KEITHLEY, R. B., OWESSON-WHITE, C., CARROLL, S., TAKMAKOV, P., MCKINNEY, C. J. and WIGHTMAN, R. M. Flexible software platform for fast-scan cyclic voltammetry data acquisition and analysis. *Anal. Chem.* **85**, (2013) 10344–10353
31. DUBOVA, N. M., SLEPCHENKO, G. B., KHLUSOV, I. A., OSTAPENKO, M. S. and NESTEROV, E. A. Voltammetric Behavior , Identifying and Quantitatively Determining Iron-Based Nanoparticles , and Evaluating Their Stability in Simulated Solutions of Gastric Juice. **2018**, (2018).
32. ALEIXO, L. M. Voltametria : Conceitos E Técnicas. *Chemkeys* (2003) 1–40.