



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Rodrigues Lousa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas de ouro aplicadas à terapia do cancro da mama” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, do Dr. João Santiago Maia, do Dr. Rui Rodrigues e do Professor Doutor Ricardo Castro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Inês Rodrigues Lousa

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas de ouro aplicadas à terapia do cancro da mama” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação, do Dr. João Santiago Maia, do Dr. Rui Rodrigues e do Professor Doutor Ricardo Castro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciência Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Eu, Inês Rodrigues Lousa, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013144424, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Nanopartículas de ouro aplicadas à terapia do cancro da mama” 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, de 2 setembro de 2019.

Inês Rodrigues Lousa

---

(Inês Rodrigues Lousa)

## **Agradecimentos**

Ao Professor Doutor Ricardo Castro, por toda a orientação dada no decorrer deste trabalho.

A toda a equipa dos Serviços Farmacêuticos do Hospital da Luz, em especial ao Dr. Rui Rodrigues, pela disponibilidade, recetividade e por toda a aprendizagem que me proporcionaram.

Ao Dr. João Maia e restante equipa da Farmácia Machado, por todas as oportunidades que me deram, pela confiança que depositaram em mim e pelo excelente ambiente de trabalho.

Ao Alexandre, por toda a companhia, paciência e ajuda dada ao longo dos últimos meses.

Aos meus pais, por toda a motivação que me deram e por todo o apoio não só nesta última fase, mas ao longo de todo o meu percurso académico.

Agradeço ainda a todos os meus amigos, em particular à Ju por me ter alimentado ao longo destes anos.

## **Resumo**

Como parte integrante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, o estágio curricular visa a aplicação dos conhecimentos teóricos adquiridos no decorrer do curso em ambiente profissional, finalizando assim o plano curricular.

Existindo a possibilidade de optar por diferentes modalidades de estágio, optei por realizar o mesmo em Farmácia Comunitária e Farmácia Hospitalar, no sentido de contactar com mais de uma área profissional. Assim sendo, estão incluídos neste documento ambos os relatórios de estágio, realizados em formato de análise SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats).

O cancro é atualmente o problema de saúde mais grave para a população, com expectativas de se tornar na principal causa de morte e na maior barreira contra o aumento de expectativa de vida. Em particular, o cancro da mama é o que mais afeta o sexo feminino, apresentando-se como um problema de elevado impacto na nossa sociedade, não só pela gravidade e incidência, mas também devido ao facto de atingir um órgão de enorme simbolismo na maternidade e na feminilidade. Em Portugal constitui o carcinoma com maior número de casos registados anualmente com uma taxa de mortalidade consideravelmente elevada, que lhe confere um lugar no Top 5 de cancros com maior mortalidade.

As terapias atuais contra o cancro da mama sofrem de diversas desvantagens e a pesquisa de novas terapias nunca foi tão intensa e necessária. Neste campo, as nanopartículas de ouro dispõem de um leque de propriedades únicas que as transformaram numa promessa para o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e tratamento contra o cancro da mama.

**Palavras-chave:** estágio, farmácia hospitalar, farmácia comunitária, cancro da mama, nanopartículas de ouro.

## **Abstract**

As an integral part of the Integrated Master in Pharmaceutical Sciences, the curricular internship aims at the application of the theoretical knowledge acquired during the course in a professional environment, thus finalizing their curriculum plan.

Given the possibility of choosing between different internship modalities, I opted for community pharmacy and hospital pharmacy so that I could be involved in more than one professional area. Therefore, this document contains both my internship reports, which are structured as a SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats) analysis.

Cancer is nowadays the most concerning health issue for populations, with expectations it will become the utmost death cause and the most imposing barrier for increase in average life expectancy. In particular, Breast Cancer is the one that mostly affects females, being a problem with high social impact, not only for its severity and incidence, but also due to the fact that the organ affected is full of symbolism in maternity and femininity. In Portugal, breast cancer stands as the one with higher number of new cases registered per year with a considerably high mortality rate. It sits in the top 5 of cancers with highest mortality.

Current therapies against breast cancer suffer from several drawbacks and research for new therapies has never been so intense and essential. In this field, gold nanoparticles possess a variety of unique properties that make them a promise for the development of diagnostic and treatment techniques for breast cancer.

**Keywords:** internship, hospital pharmacy, community pharmacy, breast cancer, gold nanoparticles

## Índice

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

Abreviaturas.....	10
1. Introdução.....	11
2. Apresentação da Farmácia Machado.....	11
3. Análise SWOT .....	12
3.1. Quadro sumário da análise SWOT.....	12
3.2. Pontos Fortes.....	12
3.2.1. Localização .....	12
3.2.2. Instalações .....	13
3.2.3. Equipa .....	13
3.2.4. Sifarma2000® .....	14
3.2.5. Fichas de clientes .....	14
3.2.6. Protocolos.....	15
3.2.7. Aplicação de conhecimentos adquiridos .....	15
3.3. Pontos Fracos .....	15
3.3.1. Fraca formação em produtos de saúde não sujeitos a receita medica.....	15
3.3.2. Conhecimento limitado de Posologias, Doses e Duração de Tratamentos .....	16
3.3.3. Receitas Manuais.....	16
3.4. Oportunidades.....	16
3.4.1. Formações.....	16
3.4.2. Gestão de uma Farmácia.....	16
3.5. Ameaças .....	17
3.5.1. Medicamentos esgotados.....	17
3.5.2. Descrédito em relação aos estagiários .....	17
3.5.3. Crise económica .....	17
3.5.4. Locais de venda de MNSRM.....	17
4. Casos Práticos.....	18
5. Considerações Finais .....	19

### Parte II – Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas.....	22
1. Introdução.....	23
2. Hospital da Luz.....	23
3. Análise SWOT .....	24
3.1. Quadro sumário da análise SWOT.....	24

3.2.	Pontos Fortes.....	25
3.2.1.	Localização e Instalações.....	25
3.2.2.	Equipa .....	25
3.2.3.	Designação por DCI .....	26
3.2.4.	Passagem por diversos sectores.....	26
3.2.5.	Farmacotecnia.....	26
3.2.6.	Distribuição individual diária em dose unitária .....	27
3.2.7.	Sistema informático .....	27
3.2.8.	Aplicação de conhecimentos teóricos .....	28
3.3.	Pontos Fracos .....	29
3.3.1.	Duração do estágio .....	29
3.3.2.	Tarefas rotineiras.....	29
3.3.3.	Falta de conhecimentos teóricos em certas áreas .....	29
3.4.	Oportunidades.....	29
3.4.1.	Formações .....	29
3.4.2.	Visita ao serviço de ambulatório do Hospital Beatriz Ângelo .....	29
3.4.3.	Visita à Radiofarmácia e ao Bloco Operatório.....	30
3.4.4.	Visitas clínicas .....	30
3.5.	Ameaças .....	30
3.5.1.	Panorama económico .....	30
4.	Considerações Finais .....	31
5.	Bibliografia.....	32

### **Parte III – Nanopartículas de Ouro Aplicadas à Terapia do Cancro da Mama**

	Lista de Figuras.....	34
	Lista de Abreviaturas .....	35
1.	Introdução.....	36
2.	Cancro da mama.....	37
2.1.	Classificação histológica e molecular .....	38
2.2.	Sintomas e fatores de risco .....	38
2.3.	Diagnóstico e estadio.....	39
2.4.	Tratamento convencional.....	40
3.	Nanomedicina.....	42
3.1.	Nanopartículas de Ouro.....	42
3.2.	Síntese de Nanopartículas de Ouro.....	43
3.3.	Funcionalização e vectorização .....	49
3.4.	Aplicações no diagnóstico .....	51
3.5.	Aplicações no tratamento .....	52



3.5.1.	Terapia Fototérmica.....	52
3.5.2.	Radioterapia .....	54
3.5.3.	Drug Delivery .....	55
3.5.4.	Inibição da Angiogénese .....	56
3.5.5.	Toxicidade .....	58
4.	Perspetivas futuras .....	59
5.	Conclusão.....	60
6.	Bibliografia.....	61
7.	Anexos.....	67

# Parte I

## Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Machado

Janeiro 2019 - Abril 2019

Orientador: Dr. João Santiago Maia



## **Abreviaturas**

**ANF** – Associação Nacional de Farmácias

**CHUC** – *Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra*

**DCI** – Denominação Comum Internacional

**FFUC** – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

**IPO-Coimbra** – Instituto Português de Oncologia de Coimbra

**LIGA** – Liga Portuguesa Contra o Cancro

**MNSRM** – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

**MSRM** – Medicamento Sujeito a Receita Médica

**SWOT** – *Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **I. Introdução**

De acordo com o Estatuto dos farmacêuticos, o farmacêutico é um agente de saúde que tem como dever executar todas as tarefas relacionadas com os medicamentos, contribuir para a salvaguarda da saúde pública e promoção da saúde. Tem como principal responsabilidade a saúde e o bem-estar do doente, assim como promover o acesso a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança <sup>1</sup>.

A Farmácia Comunitária é a face mais visível da profissão de farmacêutico, muitas das vezes representa o primeiro e/ou o último contacto dos utentes com os serviços de saúde. Em Portugal, as Farmácias Comunitárias estão distribuídas por todo o país permitindo assim, independentemente da localização geográfica, o acesso a medicamentos e equidade na prestação de cuidados de saúde a todos os cidadãos. Atualmente, as Farmácias Comunitárias disponibilizam cada vez mais serviços essenciais à saúde do utente, tanto a nível preventivo como terapêutico.<sup>2</sup>

Após nove semestres de aulas teóricas e práticas chega a hora da realização do estágio curricular, onde é possível consolidar e pôr em prática toda a aprendizagem consolidada durante o percurso académico. Realizei o meu estágio em Farmácia Comunitária entre os dias 7 de janeiro e 26 de abril de 2019 na Farmácia Machado em Coimbra, sob a orientação do Dr. João Santiago Maia, proprietário e Diretor Técnico da Farmácia. A escolha desta Farmácia deveu-se ao bom nome da instituição e à sua localização.

O presente relatório pretende analisar retrospectivamente esta experiência através de uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities e Threats*), onde irei referir a experiência que adquiri, a aplicação de todo o conhecimento teórico adquirido até à data e a adequação do curso às perspetivas profissionais futuras.

## **2. Apresentação da Farmácia Machado**

A Farmácia Machado é uma Farmácia que presta serviços desde 1917, pertencendo sempre à família do atual proprietário e Diretor Técnico Dr. João Santiago Maia. Há cerca de um ano mudou de instalações, localizando-se agora na Rua Bernardo Albuquerque N°19B, 3000-072, Coimbra.

Encontra-se aberta de segunda-feira a sexta-feira, das 8h às 21h, aos sábados das 9h às 13h e encerrando aos domingos e feriados. A equipa é composta por cinco farmacêuticos e um técnico. Tem disponível quatro balcões de atendimento e um gabinete, utilizado para a determinação da glicemia, administração de vacinas e medicamentos injetáveis. Neste mesmo gabinete existem ainda semanalmente consultas de nutrição.

### 3. Análise SWOT

#### 3.1. Quadro sumário da análise SWOT

*Tabela 1 - Quadro sumário da análise SWOT.*

Pontos Fortes	Localização Instalações Equipa Fichas de clientes Protocolos Capacidade de solucionar problemas aos clientes
Pontos Fracos	Fraca formação em produtos de saúde não sujeitos a receita médica Conhecimento limitado de posologias, doses e duração de tratamento Restrições na dispensa de MSRM e comunicação com os utentes Receitas Manuais
Oportunidades	Formações Gestão de uma farmácia
Ameaças	Medicamentos esgotados Falta de confiança nos genéricos Descréditos em relação aos estagiários Crise económica Locais de venda de MNSRM

#### 3.2. Pontos Fortes

##### 3.2.1. Localização

A Farmácia Machado tem uma localização privilegiada e encontra-se numa das zonas mais movimentadas de Coimbra. É frequentada por uma enorme diversidade de clientes devido ao facto de estar perto do IPO, dos CHUC, do centro de saúde de Celas, de várias clínicas e laboratórios, universidades, bares, restaurantes e no seio de uma enorme área

residencial. Graças a estar localizada na mesma rua há bastante tempo, tem muitos clientes fidelizados que a frequentam regularmente, facilitando a formação de uma relação de confiança e um acompanhamento mais completo e personalizado.

Os clientes da Farmácia Machado apresentam uma elevada heterogeneidade, o que se revelou uma mais valia no decorrer do estágio já que me permitiu contactar com diversos tipos de clientes e me desafiou para o facto de ter que adaptar o meu atendimento e adequar o meu discurso.

### **3.2.2. Instalações**

A Farmácia mudou de instalações há cerca de um ano para um espaço totalmente remodelado, espaçoso e bem equipado. Possui quatro balcões de atendimento, um gabinete, um laboratório, e locais específicos para entrada de encomendas e outros serviços de gestão interna da Farmácia.

No gabinete são realizadas consultas de nutrição e a realização de serviços farmacêuticos como: medição de parâmetros bioquímicos (por exemplo glicémia), administração de vacinas e medicamentos manipulados e medição da tensão arterial.

Durante o estágio verifiquei que muitos doentes se dirigiam à farmácia apenas para medir a tensão arterial. Após a medição fornecia-se um cartão com o registo dos valores ou anotava-se num previamente dado ao utente, para que este pudesse monitorizar ou apresentar ao seu médico.

### **3.2.3. Equipa**

A equipa é constituída pelo Dr. João Santiago Maia, proprietário e Diretor Técnico, pela Dra. Graziela Grade, Farmacêutica Adjunta Substituta, pela Dra. Mariana Lopes, Farmacêutica, pela Dra. Ana Rita Garrett, Farmacêutica e pelo Sr. Eduardo Cruz, Técnico de Farmácia. Cada membro é essencial e indispensável ao bom funcionamento da farmácia, formando uma equipa equilibrada, responsável e com tarefas bem definidas.

Devido à boa disposição demonstrada e ao espírito de entreatajuda, tive a minha integração como estagiária muito facilitada. Sempre que necessitei de apoio todos os elementos se mostraram disponíveis, sem exceção. Além disso, devido ao excelente profissionalismo, valências, organização e dinamismo que constituem esta equipa tive oportunidade de evoluir significativamente em termos de conhecimentos e capacidade de lidar com os clientes.

### **3.2.4. Sifarma2000®**

O sistema informático usado pela farmácia é o Sifarma2000®, responsável pelos processos de gestão (gestão de stocks, encomendas, entre outros) e prestando auxílio no atendimento. Disponibiliza informação técnica e científica atualizada sobre os medicamentos e produtos de saúde, servindo de apoio e complemento para um correto aconselhamento. Pode ainda servir para esclarecer eventuais dúvidas que surjam durante o atendimento, tais como posologia, doses, interações, reações adversas, efeitos secundários, indicação terapêutica e composição.

O primeiro contacto que tive com este sistema informático foi durante o meu percurso na FFUC, onde em algumas unidades curriculares tive oportunidade de trabalhar com o módulo de atendimento do Sifarma 2000®. Durante o estágio tive oportunidade de aperfeiçoar e aprender mais acerca deste software, trabalhei como o sistema para a receção e criação de encomendas, devoluções e respetivas regularizações, consultei históricos de compra e vendas de produtos, entre outros. Além disso, durante o atendimento, a possibilidade de poder consultar informações científicas sobre o produto que estava a dispensar permitiu que pudesse esclarecer imensas dúvidas e ser mais autónoma e confiante.

O Sifarma 2000® garante um serviço de qualidade e uma maior segurança durante o atendimento, sendo uma ferramenta essencial para o bom funcionamento da farmácia.

### **3.2.5. Fichas de clientes**

O facto de a Farmácia ter um conjunto alargado de clientes regulares permite a criação de fichas no Sifarma 2000®, onde ficam registados os dados pessoais dos clientes, créditos e histórico de compras. Estas fichas permitem então que os clientes tenham um atendimento mais personalizado e facilitam o acompanhamento farmacoterapêutico, tornando-o mais seguro, correto e eficaz. Uma vez que as receitas são prescritas em DCI, através das fichas é possível fazer uma consulta do histórico de compras no sentido de confirmar não só a medicação, mas também qual o laboratório habitual. Como a maioria dos clientes que toma medicação para doenças crónicas tem uma idade avançada, a cedência de uma embalagem de medicamentos com um aspeto diferente pode causar confusão e a toma de uma forma errada.

Caso o utente possua Cartão Saúde, este encontra-se associado à ficha de cliente permitindo um atendimento mais rápido e uma maior comodidade, evitando que este tenha de ser sempre apresentado em todas as compras.

### **3.2.6. Protocolos**

A Farmácia Machado é membro da Associação Nacional das Farmácias (ANF) e aderente ao programa das Farmácias Portuguesas. Deste programa faz parte o Cartão Saúde, que beneficia o utente através da possibilidade de rebate de pontos, pontos estes, que podem ser trocados por produtos presentes no catálogo de pontos ou, em alternativa, podem ser convertidos em vales monetários que são utilizados para pagar a conta. Este Cartão oferece ainda vales de desconto em artigos, descontos no cinema, entre outras vantagens.

A proximidade ao IPO-Coimbra, levou à realização de um protocolo entre a Liga Portuguesa Contra o Cancro e a Farmácia Machado. O protocolo estabelecido baseia-se numa comparticipação por parte da Liga Portuguesa Contra o Cancro. Os utentes são responsáveis por apresentar um documento onde vem referenciado o número de receitas abrangidas, o limite da comparticipação ou o número de embalagens a dispensar. Desta forma os encargos do utente relativamente à medicação são aliviados. No final de cada mês a Farmácia Machado credita o valor da despesa à Liga Portuguesa Contra o Cancro.

### **3.2.7. Aplicação de conhecimentos adquiridos**

Após os 9 semestres de formação na FFUC adquiri conhecimentos que apliquei desde o primeiro dia de estágio. Constatei que algumas unidades curriculares são imprescindíveis para o dia-a-dia de um farmacêutico comunitário. Farmacologia I, Farmacologia II, Farmacoterapia e Farmácia Clínica são, na minha opinião, essenciais para o atendimento ao público. Por outro lado, Deontologia e Legislação Farmacêutica, Organização e Gestão Farmacêutica forneceram-me uma maior compreensão da parte da gestão da Farmácia.

## **3.3. Pontos Fracos**

### **3.3.1. Fraca formação em produtos de saúde não sujeitos a receita medica**

A Farmácia Machado possui uma grande variedade de produtos de dermocosmética, puericultura, suplementos alimentares e dispositivos médicos. Nos dias de hoje a suplementação alimentar e a dermocosmética são áreas cada vez mais procuradas, onde é necessário um aconselhamento personalizado para que seja possível fornecer o produto mais adequado as necessidades de cada pessoa.

Devido à grande procura, deparei-me várias vezes com a necessidade de aconselhar e esclarecer clientes neste tipo de produtos e verifiquei que tinha bastante dificuldade. Com a ajuda dos meus colegas, com a participação em formações e pesquisa autónoma, melhorei significativamente os meus conhecimentos.



Apesar do plano curricular do MICEF possuir unidades curriculares que abordam estas áreas, achei que não era suficiente, deparando-me várias vezes com a inexistência de conhecimentos sobre certos temas e a dificuldade de aplicar os conhecimentos que possuía.

### **3.3.2. Conhecimento limitado de Posologias, Doses e Duração de Tratamentos**

No decorrer do estágio surgiram várias questões relativas a posologia, doses e duração de tratamentos. Esta dificuldade era mais acentuada em MNSRM. Inicialmente recorria aos meus colegas ou ao Sifarma 2000® para obter informações e esclarecimento de dúvidas, de forma a conseguir ceder uma informação correta e segura ao cliente. Com o passar do tempo fui decorando algumas posologias, doses e duração de tratamento.

O acompanhamento de grupos específicos (grávidas, crianças, lactentes, idosos) também se demonstrou uma dificuldade, devido às suas necessidades especiais e específicas implicando uma atenção e cuidados redobrados.

### **3.3.3. Receitas Manuais**

Devido à falta de experiência e conhecimentos, inúmeras vezes senti dificuldade em perceber a letra do médico, vendo-me obrigada a recorrer a outros membros da equipa para pedir ajuda. Aos poucos foi tornando-se mais intuitivo.

## **3.4. Oportunidades**

### **3.4.1. Formações**

Ao longo do estágio tive a oportunidade de participar em formações da curaprox, Matriderm e Velvetmed, formações estas que me proporcionaram um maior conhecimento dos correspondentes produtos e a sua aplicabilidade.

Sem dúvida que as formações foram uma mais valia, adquiri conhecimento que posteriormente pude colocar em prática durante o aconselhamento aos utentes.

### **3.4.2. Gestão de uma Farmácia**

Para além do atendimento ao público, tive a oportunidade de consolidar conhecimentos sobre a gestão de uma Farmácia. Pude observar a gestão de receituário, a gestão de stocks e realizei tarefas tais como conferir receituário, realização e receção de encomendas, devoluções e respetivas regularizações, verificação de stocks e prazos de validade, entre outras tarefas relacionadas com a gestão da Farmácia Machado.

### **3.5. Ameaças**

#### **3.5.1. Medicamentos esgotados**

Durante o decorrer do meu estágio foram vários os medicamentos esgotados a nível nacional, o que cria de certa forma um ligeiro descontentamento nos utentes, que apesar de compreenderem que o problema não é restrito à Farmácia Machado, esperam também uma solução.

A maioria dos medicamentos esgotados com que me defrontei eram medicamentos para tratamentos crónicos, tais com a Aspirina GR<sup>®</sup>, Xarelto<sup>®</sup>, Lasix<sup>®</sup>, entre outros. O caso do Lasix<sup>®</sup> foi bastante complicado devido ao facto de os médicos não serem a favor dos genéricos existentes para este medicamento.

O facto de haver imensos medicamentos esgotados constitui assim uma ameaça para o normal funcionamento de uma farmácia e para a vida dos utentes.

#### **3.5.2. Descrédito em relação aos estagiários**

Durante o meu estágio foram alguns os utentes que recusaram o atendimento por parte de estagiários invocando a nossa falta de experiência e o facto de demorarmos mais tempo a realizar o atendimento. Ao início, essa recusa afetou de certa forma a minha confiança enquanto estagiária, dificultando a minha aprendizagem. No entanto, não sendo frequente um utente tomar essa posição, adquiri experiência e cumprir o meu papel da melhor forma possível.

#### **3.5.3. Crise económica**

A crise económica do país é um fator prejudicial ao setor farmacêutico. Os baixos salários e a redução das participações em alguns medicamentos, fazem com que os utentes na hora de realizarem a compra da sua medicação tenham em séria consideração o peso desta no orçamento mensal.

Quando se tratava de clientes habituais, uma hipótese de aliviar o problema monetário, passava por realizarmos vendas suspensas de forma a que o utente pudesse levar a medicação toda e pagar mais tarde. Ainda assim, vários utentes decidiam não a levar devido ao seu preço, ignorando a importância que os medicamentos têm para a manutenção da sua saúde.

#### **3.5.4. Locais de venda de MNSRM**

Os locais de venda de MNSRM contribuíram bastante para a fragilidade económica das Farmácias, devido ao facto de fazerem parte de grandes grupos comerciais com um maior

poder de compra e onde conseguem mais descontos, o que lhes permite praticar preços de venda ao público mais acessíveis do que os praticados na Farmácia.

Muitas das vezes quem realiza o atendimento neste tipo de estabelecimentos não está preparado para o fazer, o que poderá levar a um mau aconselhamento ao utente e a um uso incorreto dos medicamentos, inevitavelmente com consequências graves na saúde.

#### **4. Casos Práticos**

##### **Caso prático I**

Uma utente do sexo feminino com cerca de 21 anos dirigiu-se à farmácia mencionando que estava no período de exames e que se encontrava com dificuldades em dormir. Começo por questionar se a dificuldade é em adormecer ou se acorda repetidamente durante a noite, ao que a utente responde que o maior problema está em adormecer e que poderá ser derivado à ansiedade dos exames. Posto isto, aconselhei o Stressil Noite<sup>®</sup>, devido a ter na sua composição melatonina, um indutor de sono, valeriana, passiflora, camomila e lupulo, que possuem propriedades sedativas e relaxantes. Recomendei a toma meia hora antes de ir dormir, e ainda a adoção de uma rotina de sono constante. Indiquei ainda que a prática de atividades relaxantes, como por exemplo a toma de um banho de água quente, a poderia ajudar.

##### **Caso pratico II**

Uma utente do sexo feminino com cerca de 28 anos dirigiu-se à farmácia, com uma prescrição de fosfomicina para uma infeção urinaria. No decorrer do atendimento, a utente mencionou que não se tratava de um caso isolado, o que me levou a recomendar medidas preventivas tais como, ingestão abundante de água, evitar roupa interior sintética e fazer uma boa higiene íntima.

No que respeita à toma do antibiótico, referi que deve ser feita com o estomago vazio, 1h antes ou 2h após a refeição, e com a bexiga vazia. Para além de ter cedido o antibiótico, aconselhei também a toma de um suplemento com arando vermelho (*Vaccinium macrocarpon*) que inibe a aderência das bactérias ao trato urinário, prevenindo as infeções do mesmo.

## 5. Considerações Finais

O estágio em Farmácia Comunitária consta do currículo de ciências farmacêuticas e é uma etapa fulcral na transição do estudante para profissional de saúde. A realização deste estágio permitiu-me aplicar todos os conteúdos estudados durante o percurso académico, num ambiente real e profissional, ainda com alguma supervisão e orientação que considereei essenciais e pela qual agradeço desde já à equipa da Farmácia Machado que me acompanhou.

No decorrer destes 4 meses sempre me foram atribuídas tarefas variadas, com responsabilidades distintas e desde o início que fui incentivada a ser autónoma, a opinar e a ser crítica. Respeitando sempre o código deontológico tentei corresponder e superar a todas as expectativas, ultrapassar as dificuldades e cumprir com os objetivos apontados ao estagiário. Para isso foi necessária toda a equipa de profissionais que me acompanhou, utilizando a sua experiência para me orientar da melhor maneira no sentido de me preparar para o dia a dia desta profissão.

Ao concluir este estágio percebo que o papel do farmacêutico vai muito além do fornecimento de medicamentos. O contacto com os utentes, muitas vezes ainda não diagnosticados, é de elevada importância e responsabilidade social. Cabe-nos a nós, tanto como estagiários como profissionais, garantir que informamos o paciente de maneira correta o que se revelou uma tarefa muito exigente. Destaco a evolução da minha capacidade para interagir com os utentes como a maior benesse deste período.

Concluo afirmando que toda esta experiência foi extremamente positiva e bem sucedida. A Farmácia Machado mostrou ser um local de excelência, onde me senti bem integrada e, acima de tudo, onde depositaram em mim a confiança necessária para a criação de um ambiente de trabalho muito favorável à minha aprendizagem. Sinto que me foi fornecida uma excelente base de conhecimentos que servem de ponto de partida para a minha carreira. Saio ainda com noção de que esta profissão requer constante atualização e dedicação para ser bem desempenhada.

## 6. Bibliografia

1. Decreto-Lei n.º 288/2001, Diário da República - I Série A. Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos. (01- 7150–7165.
2. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **A Farmácia Comunitária** [Consult. 2 mai. 2019]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>

# **Parte II**

## **Relatório de Estágio em Farmácia Hospitalar**

Serviços Farmacêuticos do Hospital da Luz Lisboa

Maio 2019 - Junho 2019

Orientador: Dr. Rui Rodrigues



## **Abreviaturas**

**ADSE** – Assistência na Doença aos Servidores do Estado

**DCI** – Denominação Comum Internacional

**HBA** – Hospital Beatriz Ângelo

**HDM** – Hospital de Dia Médico

**HL** – Hospital da Luz

**MICF** – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

**NOAC's** – *New Oral Anticoagulants*

**SFH** – Serviços Farmacêuticos Hospitalares

**SWOT** – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## **I. Introdução**

De acordo com o Decreto-Lei n.º 44.204, de 22 de fevereiro de 1962, a Farmácia Hospitalar define-se como o “conjunto de atividades farmacêuticas exercidas em organismos hospitalares, ou serviços a eles ligados, para colaborar nas funções de assistência que pertencem a esses organismos e serviços e promover a ação de investigação científica e de ensino que lhes couber”<sup>1</sup>.

Os Serviços Farmacêuticos Hospitalares (SFH) são setores tecnicamente e cientificamente autónomos, que atuam sob supervisão das administrações hospitalares. A Farmácia é um departamento imprescindível do hospital, fazendo parte integrante da aquisição e gestão dos medicamentos, da sua preparação e ainda na distribuição pelos blocos e enfermarias. A direção técnica dos SFH é da responsabilidade de um farmacêutico hospitalar<sup>23</sup>.

No âmbito do plano curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, a realização de estágios curriculares pretende aplicar em situação de prática profissional todos os conteúdos lecionados em ambiente académico. A opção pela Farmácia Hospitalar passou pelo interesse pessoal na área e pelo desejo de conhecer melhor este setor, aproveitando a oportunidade de me desviar da prática mais comum de Farmácia Comunitária e contactar com uma realidade diferente.

O Hospital da Luz, conhecido como um local de qualidade, foi a minha escolha não só por razões técnicas, mas também pela conveniência pessoal da localização do estabelecimento. O estágio decorreu entre 2 de maio e 28 de junho de 2019 nos Serviços Farmacêuticos do Hospital da Luz, sob orientação do Dr. Rui Rodrigues e com o acompanhamento de toda uma equipa de técnicos e farmacêuticos.

Deste modo, serve o presente relatório, elaborado com o formato de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities e Threats*), para abordar a experiência deste estágio, a adequação do mesmo às perspetivas profissionais futuras e a integração dos conhecimentos teóricos no meio profissional em cenário de Farmácia Hospitalar.

## **2. Hospital da Luz**

O Hospital da Luz (HL) é uma instituição privada inaugurada em abril de 2007, localizada em Lisboa. Representa o maior hospital da rede Luz Saúde® e é reconhecido pela medicina de excelência, inovação nos cuidados prestados e pela elevada diferenciação dos seus profissionais e serviços. Encontra-se dividido em duas vertentes, um hospital de agudos e um hospital residencial, sendo uma referência no setor não só a nível nacional, mas também a nível



internacional. Dispõe de todas as valências médicas e cirúrgicas, com infraestruturas notáveis que garantem a qualidade dos serviços de saúde prestados.

Atualmente encontra-se em construção um novo edifício, que permitirá aumentar a oferta clínica, agregar novas áreas e potenciar a formação contínua dos profissionais de saúde, mantendo os seus serviços sempre o mais atuais possível.

Os SFH do HL encontram-se em funcionamento de segunda a sexta-feira, das 9h às 20h, aos sábados das 15h as 19h, encerrando aos domingos e feriados, mas dispondo sempre de um farmacêutico de prevenção.

### 3. Análise SWOT

#### 3.1. Quadro sumário da análise SWOT

*Tabela 2- Quadro sumário da análise SWOT.*

Pontos Fortes	<ul style="list-style-type: none"><li>• Localização e Instalações</li><li>• Equipa</li><li>• Designação por DCI</li><li>• Farmacotecnia</li><li>• Distribuição individual diária em dose unitária</li><li>• Passagem por diversos setores</li><li>• Sistema informático</li><li>• Aplicação de conhecimentos teóricos</li></ul>
Pontos Fracos	<ul style="list-style-type: none"><li>• Duração do estágio</li><li>• Tarefas rotineiras</li><li>• Falta de conhecimentos teóricos em certas áreas</li></ul>
Oportunidades	<ul style="list-style-type: none"><li>• Formações</li><li>• Visita ao serviço de ambulatório do Hospital Beatriz Ângelo</li><li>• Visita à radiofarmácia e ao bloco operatório</li></ul>
Ameaças	<ul style="list-style-type: none"><li>• Panorama económico</li></ul>

## **3.2. Pontos Fortes**

### **3.2.1. Localização e Instalações**

O HL tem uma localização privilegiada na cidade de Lisboa, com acesso facilitado por transportes públicos (metro e autocarro), um parque de estacionamento pago nas instalações do hospital e zonas de estacionamento gratuito nas redondezas. Está perto de uma grande área comercial e residencial, proporcionando uma excelente localização do que permite uma fácil e rápida deslocação por parte dos clientes e colaboradores.

Os SFH do Hospital da Luz estão localizados no piso -I, encontram-se divididos em diversas áreas funcionais, tais como:

- zona administrativa;
- zona de receção de encomendas;
- locais adequados ao correto armazenamento de medicamentos;
- laboratórios para preparação de não estéreis, manipulação de citotóxicos, e preparação de nutrição parentérica;
- sala de reembalagem e sala de preparação de dose unitária;
- instalações sanitárias e balneários;
- gabinetes e sala de reuniões.

Apesar das instalações serem amplas, já demonstram não ser suficientes para suportar toda a atividade realizada no hospital, daí a ampliação do HL já em execução.

A facilidade de acesso tanto interna como externa, a implantação de todas as áreas funcionais no mesmo piso e a proximidade aos elevadores constitui uma mais valia na localização dos SFH. A proximidade ao HDM simplifica bastante o transporte e o processo de dispensa dos citotóxicos

### **3.2.2. Equipa**

A equipa é constituída por farmacêuticos, técnicos de diagnóstico e terapêutica, auxiliares de ação médica e administrativos. São atribuídas a cada membro funções e responsabilidades específicas, tornando-os todos essenciais e indispensáveis ao bom funcionamento do departamento. A equipa de farmacêuticos, para além dos cuidados orientados para o doente, também procura desenvolver atividades de formação e participação em investigação clínica.

A disponibilidade, a partilha de informação e conhecimentos, juntamente com o bom espírito de equipa, permitiu-me ter uma fácil integração, onde tive oportunidade de adquirir e conciliar conhecimentos adquiridos em algumas unidades curriculares do MICF.

### **3.2.3. Designação por DCI**

Nos SFH todos os medicamentos são identificados por Denominação Comum Internacional (DCI) o que tornou mais fácil a aplicação da teoria à prática hospitalar.

### **3.2.4. Passagem por diversos sectores**

Durante o estágio tive a oportunidade de passar por vários setores tais como:

- Produção;
- Circuito especial do medicamento (hemoderivados, psicotrópicos e estupefacientes);
- Pediatria;
- Cuidados continuados e paliativos;
- Cuidados intensivos;
- Cirurgia;
- Medicina interna;
- Ensaio clínicos;
- Dispensa de medicamentos a doentes em regime de ambulatório;
- Distribuição de medicamentos em dose individual unitária.

Na maioria dos setores assisti à interpretação e validação da terapêutica. O farmacêutico deve então dar o aval ou, caso haja discordância na adequação do tratamento, deve contactar o médico sugerindo as alterações que achar necessárias. Ficou assim clara a grande responsabilidade do Farmacêutico Hospitalar e do seu papel no bom funcionamento do hospital.

Foi assim possível adquirir conhecimentos dos diferentes setores presentes nos SFH, aplicar conhecimentos nas mais diversas áreas e no fundo obter uma experiência mais abrangente.

### **3.2.5. Farmacotecnia**

Quanto ao setor da produção, tive a oportunidade de entrar na sala de preparação de citotóxicos, na sala de preparação de nutrição parentérica e assistir à preparação de manipulados. Durante estas duas semanas, pude observar detalhadamente todo o processo da

preparação de fármacos. Em relação aos fármacos citotóxicos, foco principal deste setor ao longo do estágio, o processo passava pela validação da prescrição, preparação do tabuleiro com o material a utilizar, preparação do fármaco pelos técnicos de diagnóstico e terapêutica e, por fim, proteger e verificar a conformidade do fármaco final. Pude assim contactar com diferentes técnicas de preparação e ganhar percepção acerca das medidas de segurança envolvidas.

No decorrer da minha passagem nesta área apercebi-me que os conhecimentos teóricos adquiridos no MICF são, no meu entender, insuficientes no que respeita aos fármacos citotóxicos e à doença oncológica, consistindo grande parte da minha aprendizagem em conceitos novos.

### **3.2.6. Distribuição individual diária em dose unitária**

A distribuição de medicamentos no HL efetua-se por dose unitária, ocorrendo uma distribuição diária de medicamentos, em dose individual para um intervalo de 24 horas. Só após a validação da prescrição por parte do farmacêutico é que se dá início à preparação dos medicamentos a distribuir. O processo de preparação tem como suporte e auxílio equipamentos semiautomáticos e é feita pelos técnicos de diagnóstico e terapêutica.

A distribuição individual diária em dose unitária permite uma maior segurança no circuito do medicamento, uma redução dos riscos de interações, conhecer melhor o perfil farmacoterapêutico dos vários doentes, racionalizar melhor a terapêutica e diminuir os desperdícios.

Durante o estágio pude assistir à preparação da dose unitária e verificar as medidas de segurança aplicadas (dupla verificação, utilização de rótulos de confirmação de dose quando a dose a administrar não coincide com a dose total da embalagem, entre outras).

### **3.2.7. Sistema informático**

O sistema informático dos SFH do HL é composto por vários programas informáticos que permitem um controlo e uma eficiência de trabalho elevados. Os sistemas dividem-se de acordo com a função que desempenham. O Primavera<sup>®</sup> é um programa industrial para gestão de stocks. Permite dar entrada e saída de produtos, registar encomendas e ainda fazer uma gestão da faturação controlando custos e desperdícios. Permite ainda consultar o catálogo de fármacos e fornecedores utilizados pelo HL, garantindo assim um controlo muito eficaz do armazenamento de produtos.

Para registo e consulta do processo clínico de todos os pacientes, o software utilizado no HL é o Sorian Integrated Care<sup>®</sup> desenvolvido pela Siemens. Para cada paciente está

detalhado o perfil clínico, história clínica, histórico de prescrições e consultas médicas, análises clínicas, dados de enfermagem e exames de diagnóstico.

O programa ULISES<sup>®</sup> controla o Kardex, que consiste num sistema semiautomático que armazena, prepara e regista a Distribuição Individual Diária em Dose Unitária. Tem a estrutura de um carrossel vertical e é controlado por um computador com o correspondente sistema informático. Este carrossel automatizado movimenta prateleiras constituídas por gavetas onde se encontram armazenados os medicamentos.

Nos SF faz-se ainda o uso da aplicação Farmácia. Através desta é possível transferir as prescrições médicas efetuadas durante o período de análise e disponibiliza o perfil terapêutico do doente. Com a conjugação de ambos, é neste software que se faz a validação das prescrições. Encontra-se interligado ao Sorian<sup>®</sup> e ao ULISES<sup>®</sup>.

Na Unidade de preparação e manipulação de citotóxicos observei o uso e as funcionalidades do Oncofarm<sup>®</sup>. Nele estão inseridos todos os protocolos terapêuticos das variadas neoplasias e os esquemas terapêuticos podem ser acedidos e alterados pelo farmacêutico responsável pela oncologia. Os médicos têm também acesso ao Oncofarm<sup>®</sup> para fazer a prescrição de esquemas terapêuticos e proceder a ajustes de dose que sejam necessários. Quando a dose é administrada pelo enfermeiro, é feito no Oncofarm<sup>®</sup> um registo dessa mesma administração. Através do programa são revistas pelo farmacêutico as doses prescritas e, após validação, o programa emite as fichas de preparação com as etiquetas correspondentes. Estas etiquetas contêm informação importante como o nome e número do utente, data, dose e composição, condições de estabilidade de conservação e modo de administração. As fichas de preparação são emitidas com o esquema terapêutico correspondente, as doses e o número de frascos dos fármacos necessários para efetuar a manipulação do esquema, número do ciclo, data do ciclo anterior, nome e número de identificação do doente assim como a neoplasia respetiva.

### **3.2.8. Aplicação de conhecimentos teóricos**

Com o decorrer do estágio constatei que algumas unidades curriculares lecionadas no MICF são indispensáveis para o dia-a-dia de um Farmacêutico Hospitalar, destacando-se Farmacologia I e II, Farmacoterapia, Farmácia Clínica, Bioquímica Clínica e Farmácia Hospitalar.

Apesar de o plano de estudos do MICF nos fornecer a maioria dos conhecimentos essenciais para conseguir realizar com prestígio a profissão de Farmacêutico Hospitalar, considero o estágio um ponto essencial, permitindo consolidar e aplicar os conhecimentos teóricos que o curso nos fornece à realidade hospitalar.

### **3.3. Pontos Fracos**

#### **3.3.1. Duração do estágio**

Após terminar o estágio nos SFH do HL considero que dois meses não foram suficientes. Apesar da oportunidade de passar por todos os sectores dos SF, a falta de tempo não me permitiu adquirir a autonomia que ambicionava, nem a segurança e prática na elaboração das tarefas que me eram propostas.

#### **3.3.2. Tarefas rotineiras**

Em alguns setores as tarefas que me eram propostas ao longo do dia tornavam-se monótonas e pouco estimulantes.

#### **3.3.3. Falta de conhecimentos teóricos em certas áreas**

Ao longo deste período nos SF do HL, fui-me apercebendo que havia algumas falhas em relação ao que foi lecionado no MICF, especialmente ao que respeitava a oncologia e a falta de aprofundamento da disciplina de Farmácia Hospitalar. Apesar de ser uma cadeira complexa e exigente, deveria ser algo mais aprofundada.

Realço ainda que concluo o estágio com a noção de que, apesar de muito abrangente, o MICF é pouco específico o que impede os alunos de escolherem uma área e obterem uma especialização antes de entrarem no mercado de trabalho.

### **3.4. Oportunidades**

#### **3.4.1. Formações**

No decurso do estágio surgiu a hipótese de participar em apresentações sobre os NOAC's, em atividades realizadas nos SFH do HBA (Hospital Beatriz Ângelo) e ainda de aprender a utilizar o kit emergência em caso de derrame de citotóxicos. Realizei formações *online* em Boas Práticas Clínicas e em *Antimicrobial Stewardship*. Este género de iniciativas são sempre uma mais valia, permitindo ganhar novos conhecimentos e novas experiências.

#### **3.4.2. Visita ao serviço de ambulatório do Hospital Beatriz Ângelo**

Devido ao facto de o HL ser um hospital privado, não tem uma forte afluência no serviço de ambulatório. A medicação de ambulatório é faturada, paga pelo cliente e é fornecida por um intermediário, não entre o farmacêutico e o cliente como ocorre no HBA.

No HBA deparei-me com uma enorme afluência ao serviço de ambulatório, onde os utentes têm oportunidade de obter medicamentos para o período de um mês, havendo

algumas exceções em que o farmacêutico pode dispensar para mais tempo e de forma gratuita. Os farmacêuticos dos SFH disponibilizam também consultas a doentes que as solicitem, sendo em certos casos as consultas propostas pelo próprio Farmacêutico.

O serviço de ambulatório permitiu o contacto quase permanente com o doente, por esse motivo foi dos que mais me agradou.

### **3.4.3. Visita à Radiofarmácia e ao Bloco Operatório**

A visita à Radiofarmácia, integrada no departamento de medicina nuclear, foi outra das atividades que me propuseram. Tive assim a oportunidade de assistir à manipulação de radiofármacos, à sua administração e à realização de exames de diagnóstico. Durante estes processos foram-me explicadas quais as medidas de segurança a implementar.

Na visita ao Bloco Operatório assisti a várias cirurgias e à administração de anestésicos e de fármacos intra-operatórios eventualmente necessários, sendo sempre esclarecida pelo anestesista presente a quaisquer dúvidas que me surgissem.

### **3.4.4. Visitas clínicas**

Para além da presença nas instalações dos SFH, tive a experiência de acompanhar as equipas clínicas na visita médica aos diferentes serviços tais como, Medicina Interna, Cuidados paliativos e continuados e Cuidados intensivos.

Integrando o farmacêutico em equipas multidisciplinares, promovendo o debate acerca das terapêuticas instituídas e a partilha de conhecimentos estão sempre presentes, resultando numa aprendizagem significativa e numa melhoria do serviço prestado ao paciente.

No decorrer desta atividade observei a prática da Farmácia Clínica e correlacionei a mesma com os conteúdos teóricos lecionados na faculdade.

## **3.5. Ameaças**

### **3.5.1. Panorama económico**

Apesar do Grupo Luz e o HL constituírem uma entidade privada, estão muito dependentes do cenário económico e financeiro do país. Por um lado, estando num mundo empresarial em que a empresarialização dos hospitais é uma realidade, estão sempre suscetíveis à concorrência direta neste mercado. Isto implica a necessidade de um investimento e de uma melhoria contínua, para se manterem em competição. Por outro lado, o cenário económico do país influencia as condições para as empresas terem oportunidades

de financiamento. Como se sabe, Portugal atravessa um período instável que inevitavelmente ameaça diretamente todas as empresas, obrigando a uma gestão muito rigorosa e minuciosa.

A saúde privada em Portugal está também seriamente condicionada pelos subsistemas de saúde que, através de protocolos, financiam em percentagens significativas os tratamentos dos utentes. Com destaque de maior, a ADSE (Assistência na Doença aos Servidores do Estado) tem a sua sobrevivência ameaçada pela instabilidade financeira. Este subsistema é utilizado por mais de 1 milhão de utilizadores que o preferem a seguros de saúde por variadas razões. Caso estes subsistemas deixem de suportar os custos dos utentes o futuro dos hospitais privados é incerto. A ameaça direta sob os hospitais é também uma ameaça para a atividade farmacêutica.

#### **4. Considerações Finais**

O estágio em Farmácia Hospitalar não é parte integrante e obrigatória para a conclusão do mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia de Coimbra. No entanto, o aluno pode optar pela sua realização. Sendo uma área diferente da tradicional, a Farmácia Hospitalar suscitou logo o meu interesse para explorar uma área diferente.

A Farmácia Hospitalar envolve uma componente mais clínica que me atrai. Com a realização deste estágio ficou claro o importantíssimo papel do Farmacêutico Hospitalar, não só no controlo das terapêuticas aplicadas a todos os utentes, mas também na preparação de fármacos específicos de elevada relevância.

No decorrer destes 2 meses sempre desempenhei tarefas variadas, com responsabilidades distintas e em setores diferentes. Respeitando sempre todas as regras e instruções que me eram dadas tentei corresponder e superar todas as expectativas e cumprir com os objetivos apontados ao estagiário. Para isso, foi necessária toda a equipa de profissionais que me acompanhou, não só nos SFH mas também em todos os setores do HL.

Concretizar o estágio no Hospital da Luz foi um privilégio, tanto as instalações como a filosofia de trabalho são notórias pela qualidade. Conhecer um pouco do funcionamento do Hospital, dos colaboradores envolvidos e toda a aprendizagem foram altamente satisfatórios.

Para concluir, denoto que o estágio foi extremamente positivo, a integração nas equipas foi extremamente fácil. Fui bem recebida e os conhecimentos adquiridos são pontos a destacar. A Farmácia Hospitalar revelou-me novas perspetivas que sem dúvida vão influenciar o meu futuro como profissional.



## 5. Bibliografia

1. INFARMED - GABINETE JURÍDICO E CONTENCIOSO - Decreto-Lei n.º 44 204, de 2 de Fevereiro de 1962 Regulamento geral da Farmácia hospitalar. (1962).
2. SAÚDE, Ministério Da - **Manual da Farmácia Hospitalar**.
3. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - **Farmácia Hospitalar** [Consult. 3 jul. 2019]. Disponível em <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-hospitalar/>

## **Parte III**

# **Nanopartículas de Ouro Aplicadas à Terapia do Cancro da Mama**

Orientador: Professor Doutor Ricardo Castro

## Lista de Figuras

Figura 1 - Novos casos de cancro registados em Portugal. O colorretal agrupa vários tipos. Adaptado de <sup>2</sup> .....	36
Figura 2 - Representação anatómica da mama. Adaptado de <sup>7</sup> .....	37
Figura 3 - Aplicações relacionadas com os efeitos fototérmicos. a) destruição de células cancerígenas. b) melhoria na libertação de fármacos. c) formação de nanobolhas para aumento de contraste em exames imagiológicos. Adaptado de <sup>26</sup> .....	43
Figura 4 - Diferentes Nanopartículas de Ouro. Adaptado de <sup>27</sup> .....	43
Figura 5 - Processos Top-Down e Bottom-Up. Modificado de <sup>3</sup> .....	44
Figura 6 - Mecanismo da síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich e influência do pH. Adaptado de <sup>29</sup> .....	45
Figura 7 - Mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich. Adaptado de <sup>30</sup> .....	46
Figura 8 - Influência do pH no mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro. Adaptado de <sup>33</sup> .....	47
Figura 9 - Representação esquemática do método de Brust-Schiffrin. PTC: Catalisador de transferência de fase. RSH: dodecanotiol. Adaptado de <sup>37</sup> .....	48
Figura 10 - Mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Brust-Schiffrin. Adaptado de <sup>37</sup> .....	48
Figura 11 - Diferentes mecanismos de vectorização. A- Vectorização passiva; B- Vectorização ativa. Adaptado de <sup>44</sup> .....	50
Figura 12 - Ilustração da morte celular por terapia fototérmica. Adaptado de <sup>48</sup> .....	53

## **Lista de Abreviaturas**

**ADC** – Dicarboxilato de Acetona

**AJCC** – American Joint Committee on Cancer

**AuNPs** – Nanopartículas de Ouro

**CTAB** – Brometo de Cetrimónio

**EMT** – Transição Epitelial-Mesenquimal

**EPR** – Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentada

**ER** – Recetores de Estrogénio

**FGF** – Fator de Crescimento Fibroblástico

**HER-2** – Fator de Crescimento Epidérmico Humano 2

**NIR** – Near-Infrared

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**PDGF** – Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

**PEG** – Polietilenoglicol

**PR** – Recetores de Progesterona

**RM** – Ressonância Magnética

**TAC** – Tomografia Axial Computorizada

**VEGF** – Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## I. Introdução

O cancro representa um dos problemas mais preocupantes e atuais no que respeita a saúde. Com uma expectativa de se tornar na principal causa de morte e na mais forte barreira contra o aumento da expectativa de vida <sup>1</sup>, não é de admirar que a indústria farmacêutica tenha um foco intenso no encontro de novas terapias eficazes que contrariem esta tendência. De acordo com a organização mundial de saúde (OMS), já em 2015 o cancro representava a primeira ou segunda causa de morte em mais de 90 países.

Em particular, o cancro da mama é o mais incidente no sexo feminino com uma mortalidade relativamente elevada. Em Portugal e de acordo com dados do GLOBOCAN 2018, Figura 1, o cancro da mama encontra-se em primeiro lugar no que respeita a novos casos por ano, com uma mortalidade de 6.42% que lhe confere um lugar no top 5 <sup>2</sup>.

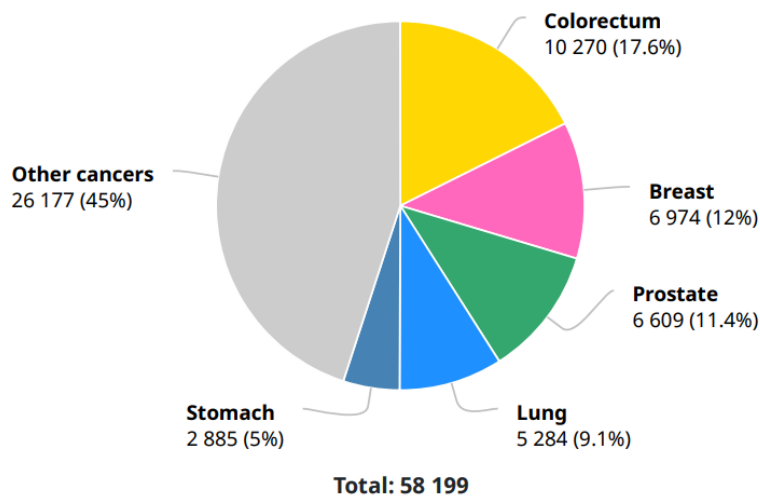


Figura 1 - Novos casos de cancro registados em Portugal no ano de 2018. O colorretal agrupa vários tipos. Adaptado de <sup>2</sup>.

No tratamento do cancro da mama, as nanopartículas de ouro receberam nos últimos anos muito interesse por parte dos investigadores. As suas propriedades exclusivas conferem-lhes enorme potencial para que sejam utilizadas na deteção e no tratamento do carcinoma de forma eficaz <sup>3</sup>.

O objetivo principal desta monografia é analisar o uso de nanopartículas de ouro no diagnóstico e tratamento do cancro da mama. Para tal, pretende-se fazer primeiro uma descrição do carcinoma da mama, incluindo os seus subtipos e características, seguida de uma análise às nanopartículas de ouro e das suas características, características estas que lhes conferem excelente potencial no tratamento do carcinoma da mama.

## 2. Cancro da mama

O carcinoma da mama é atualmente o tumor que mais afeta a mulher (apenas 1% dos homens) apresentando-se como um problema de elevado impacto na nossa sociedade. Não só devido à elevada incidência e à sua gravidade, como também pelo facto de atingir um órgão cheio de simbolismo na maternidade e na feminilidade <sup>4</sup>. O risco de ocorrência deste cancro aumenta com a idade, tendo um bom prognóstico se for detetado precocemente. As maiores dificuldades surgem quando ocorrem metástases, o que se verifica em 25% dos casos, tornando-se nesse caso incurável e representa a segunda causa de morte por cancro na mulher <sup>5</sup>. Em Portugal, anualmente são detetados cerca de 6.000 novos casos dos quais 1.500 mulheres acabam por falecer. Recentemente a tendência tem apontado para um diagnóstico cada vez mais precoce e para tratamentos mais eficazes, pelo que a taxa de mortalidade tem vindo a diminuir.

A abordagem deverá ser feita de forma multidisciplinar, ou seja, envolvendo vários profissionais de saúde para que a terapia seja o mais personalizada e adequada possível. Esta equipa deverá reunir-se antes do início dos tratamentos e sempre que se justifique. A decisão sobre a terapia a implementar deverá ter por base exames imagiológicos, laboratoriais, relatório anátomo-patológico e os dados da história clínica do doente. Após o diagnóstico e o início da terapia não deverá existir um intervalo superior a 4 semanas <sup>6</sup>. Após o tratamento, a probabilidade da ocorrência de recidivas diminui com o tempo, sendo que a maioria ocorre nos primeiros cinco anos. Caso ocorra, a recidiva é normalmente sintomática e descoberta pela própria doente <sup>6</sup>.

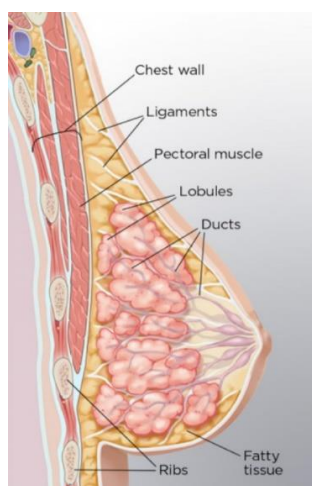


Figura 2 - Representação anatómica da mama. Adaptado de <sup>7</sup>.

## 2.1. Classificação histológica e molecular

Este cancro caracteriza-se por uma elevada diversidade clínica, morfológica e molecular, o que torna imprescindível uma classificação em subtipos. A diferenciação entre os diversos tipos de carcinomas da mama assenta no aspeto microscópico e no comportamento biológico. De acordo com a classificação histológica podem ser carcinomas *in situ* ou carcinomas invasivos.

Caso não haja evidencia de invasão do estroma circundante do sistema ductal-lobular mamário designa-se por carcinoma *in situ*. Estes dividem-se ainda em lobulares ou ductais, baseando-se esta distinção essencialmente no padrão de crescimento, nas características citológicas da lesão e na distribuição anatómica. No que respeita ao carcinoma invasivo, as células malignas induzem uma resposta fibrosa à medida que se infiltram no parênquima mamário, sendo a principal razão para a formação de uma massa palpável. Estes carcinomas são divididos em diversos subtipos, sendo o mais frequente o carcinoma ductal invasivo seguindo-se do carcinoma lobular invasivo <sup>8</sup>.

O grau histológico do tumor é um fator preponderante de prognóstico. Ao tumor é atribuído uma pontuação baseada em três características histológicas: i) a formação de ductos, ii) pleomorfismo nuclear e iii) o número de mitoses. Obtém-se assim o tumor dividido em três graus, o grau I representa um carcinoma bem diferenciado, o grau II um carcinoma moderadamente diferenciado e o grau III um carcinoma pouco diferenciado. A probabilidade de sobrevivência piora à medida que o grau histológico aumenta <sup>9,10</sup>.

A classificação molecular do carcinoma da mama é feita com base nos perfis de expressão de genes e está diferenciada em diversos subtipos. Os carcinomas de subtipos luminais, são os subtipos de cancro da mama mais frequentes e representam a maior percentagem dos cancros com recetores de estrogénios (ER) e progesterona (PR) positivos. Estão divididos em luminal A (melhor prognóstico) e luminal B. A atribuição desta nomenclatura deriva da similaridade existente entre a expressão génica do tumor e do epitélio luminal da mama. O subtipo com sobreexpressão do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2) é, tal como o nome indica, caracterizado devido à alta expressão de HER-2. Estes tumores normalmente não possuem recetores hormonais. Os subtipos basais são maioritariamente ER, PR e HER-2 negativos, ou seja, cancro da mama triplo negativo <sup>11,12,13</sup>.

## 2.2. Sintomas e fatores de risco

A causa concreta da ocorrência do cancro não é conhecida, sabe-se apenas que existem alguns fatores de risco tais como: idade avançada, histórico familiar, terapêutica hormonal de

substituição, alterações genéticas, inatividade física, obesidade entre outros. Podendo, no entanto, alguns deles ser evitados.<sup>14</sup>

Independentemente de existirem ou não fatores de risco é sempre necessário prestar atenção aos sintomas. O mais frequente é a presença de um nódulo mamário, habitualmente não doloroso, mas que pode apresentar dor, calor e rubor. Quando isto acontece deve proceder-se ao diagnóstico diferencial, sendo com mais frequência um processo infeccioso ou um quisto benigno e não um carcinoma mamário. Outros sintomas que podem ser detetados pela doente é a presença de um corrimento mamilar (normalmente unilateral e sanguíneo), alterações ao nível da pele (edemas, retração cutânea e eritema), alteração do tamanho ou forma da mama e alterações do mamilo <sup>15</sup>.

### **2.3. Diagnóstico e estadio**

A primeira etapa para estabelecer um diagnóstico passa pelo exame físico das mamas, exame este que inclui a inspeção e a palpação das mamas, e verificar quais os exames complementares necessários. Caso seja identificada alguma anomalia suspeita, a doente deve ser submetida a uma mamografia que pode ser complementada por uma ecografia mamária.

A deteção do cancro da mama pode ser através de exames imagiológicos de rastreio ou de profilaxia. O exame principal de diagnóstico é a mamografia, sendo também muito utilizada a ecografia como exame complementar na deteção de tumores em mamas densas sem tradução mamográfica ou em mulheres jovens. A ressonância magnética é o método mais sensível e é frequentemente usado em doentes com elevado risco de desenvolver a doença ou em casos de carcinoma oculto. Normalmente também é hábito realizar a ressonância magnética em doentes candidatas a cirurgia conservadora <sup>16,17</sup>.

A imagiologia contribui ainda para o diagnóstico definitivo do cancro da mama, devido ao facto de servir como guia para a colheita de material analisado em exames citológicos e histológicos, nomeadamente punções aspirativas, microbiopsias e biopsias assistidas por vácuo. As técnicas de biopsia guiadas por imagem permitem também o diagnóstico de lesões subclínicas de forma pouco invasiva. Caso se suspeite de malignidade, é necessário um diagnóstico histológico definitivo antes de instituir uma terapêutica <sup>6</sup>.

Imediatamente após haver conhecimento dos resultados do estudo histopatológico, do exame físico e dos exames imagiológicos, deve ser feita uma avaliação da extensão do tumor (estadiamento). Para proceder a essa avaliação utiliza-se a nomenclatura TNM, baseada no sistema proposto pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*. Este sistema avalia a dimensão do tumor (T), a presença ou ausência de metástases nos gânglios linfáticos regionais (N) e as metástases à distância (M). A versão mais atual deste critério data de 1 de janeiro de



2017 e inclui dois grupos de prognóstico. Um clínico (cTNM) e um patológico (pTNM), que se diferenciam pela maneira como a informação é obtida. Mais informações detalhadas acerca deste método de classificação podem ser encontradas no Anexo I. Com fundamento nos estadios clínicos pode classificar-se o cancro como operável ou não operável. Nos estadios I e II assintomáticos, não estão indicados exames adicionais além dos usados no diagnóstico, sendo a incidência de metástases relativamente baixa. Pelo contrário, em doentes com cancro no estadio III ou IV as metástases ocultas são mais frequentes e recomenda-se a realização de exames complementares <sup>15</sup>.

## **2.4. Tratamento convencional**

O tratamento do cancro da mama tem vindo a melhorar significativamente nos últimos anos, levando a um melhor controlo da doença e a uma diminuição da probabilidade de recidiva. Atualmente, existem várias opções de tratamento tais como a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapêutica hormonal e terapêuticas dirigidas. A escolha do tratamento é dependente do estadio da doença. Juntamente com a terapia instituída são regularmente administrados medicamentos para o controlo das dores ou sintomas <sup>18</sup>.

### **2.4.1. Tumores em Estadios Iniciais**

Para tumores em estadios iniciais é prática regular a terapêutica inicial passar por cirurgia (conservadora ou mastectomia total) acompanhada, ou não, por radioterapia. Após o tratamento local, a terapêutica sistémica adjuvante aplicada tem como base as características do tumor, tal como o tamanho, o grau histológico, o estadio, os recetores de estrogénios, de progesterona e a expressão de HER2.

A terapia com conservação da mama define-se como a cirurgia conservadora conjugada com radioterapia. A opção por esta via visa manter uma mama esteticamente aceitável com uma baixa taxa de recidiva. Estudos clínicos comprovam que esta terapia fornece uma taxa de sobrevivência equivalente à mastectomia total <sup>19,20</sup>, ou até mesmo resultados melhores <sup>21</sup>.

Os critérios que excluem a possibilidade de conservar a mama incluem:

- tumor grande em relação ao tamanho da mama;
- doença multicêntrica;
- existam persistentemente margens positivas;
- antecedentes de radioterapia no peito.

É ainda possível realizar cirurgia conservadora em pacientes com critérios de exclusão caso seja aplicada terapia neoadjuvante. Caso a terapia conservadora não seja viável ou por

opção do próprio doente a mastectomia é a opção que se segue. A radioterapia após mastectomia está indicada para pacientes com elevado risco de recidiva.

Para tumores em estadio inicial a terapia adjuvante a aplicar é dependente das suas características. Tumores com recetores hormonais positivos são alvo de terapia endócrina adjuvante, mas caso o tumor apresente características de alto risco (cancros envolvendo margens profundas ou com nódulos linfáticos axilares envolvidos) devem ser submetidos a quimioterapia adjuvante. Em tumores com sobreexpressão de HER-2 deverá ser administrada terapia específica e dirigida ao HER-2. Caso o tumor seja ER, PR e HER-2 negativo administra-se quimioterapia, especialmente para tumores maiores de 0,5 cm (dimensões menores a quimioterapia proporciona pouco ou nenhum benefício em termos de sobrevivência). Os doentes com carcinomas triplo negativo não são candidatos à terapia hormonal nem à terapia dirigida ao HER-2, sendo a quimioterapia a única opção para terapia adjuvante, antes ou depois da radioterapia <sup>22</sup>.

#### **2.4.2. Tumores em estadios avançados**

Tumores em estadios avançados requerem terapias multimodais que englobem terapias locais e sistémicas, neoadjuvantes e adjuvantes. O risco elevado de recidivas e metástases <sup>23</sup>, leva a que se evite partir de imediato para cirurgia.

O tratamento com terapias neoadjuvantes vai na tentativa de iniciar uma reação do tumor antes da cirurgia local. A seleção da terapia depende novamente das características do tumor. Regra geral, para pacientes com recetores hormonais positivos é recomendada a quimioterapia ao invés de terapia endócrina. Isto porque a primeira leva a respostas mais rápidas e em menores períodos de tempo. Caso tenha sobreexpressão de HER-2, agentes dirigidos devem ser aplicados ao regime de quimioterapia.

Após a terapêutica neoadjuvante, todos os doentes devem ser submetidos a cirurgia local, independentemente de a resposta ao tratamento inicial ser completa ou não. A escolha entre cirurgia conservadora ou completa depende do tratamento inicial e dos critérios referidos no tratamento de cancros em estadios iniciais na subsecção anterior.

No que toca a terapia adjuvante a via a seguir orienta-se a partir do estado clínico do paciente e da caracterização do tumor. Pacientes com recetores hormonais positivos devem receber terapêutica endócrina de modo a reduzir as probabilidades de recidiva e mortalidade, a terapêutica é dependente do facto de a mulher se encontrar, ou não, na menopausa. Caso não se verifique sobreexpressão HER-2, quimioterapia adjuvante é aplicável caso não haja resposta total no tratamento neoadjuvante. Todos os doentes com sobreexpressão de HER-

2 positivo devem seguir terapêutica adjuvante dirigida que varia consoante a resposta do tumor <sup>22</sup>.

### **3. Nanomedicina**

A nanomedicina pode-se definir como o ramo da nanotecnologia que se dedica à saúde e ao desenvolvimento de técnicas terapêuticas inovadoras. O uso de materiais com dimensões entre 1 e 100 nm tem mostrado grande potencial devido às suas propriedades características. Em específico, no tratamento do cancro a utilização de nanopartículas tem sido amplamente estudada com expectativas de sucesso elevadas.

Na sua maioria, as terapias atuais contra o cancro têm dificuldade em distinguir as células cancerígenas das células saudáveis, o que leva a que ambas possam ser alvos. Consequentemente, efeitos adversos podem surgir assim como níveis elevados de toxicidade sistémica. Para além da baixa especificidade, também a libertação rápida dos fármacos e a reduzida biodisponibilidade implicam administração de concentrações elevadas <sup>24</sup>.

A nanotecnologia é responsável por, nos últimos anos, criar o que se designa por terapia dirigida. As propriedades exclusivas destes materiais tais como, elevado rácio superfície/volume, perfis de libertação de fármacos favoráveis e a possibilidade de fazer modificações de modo a atingir alvos específicos fazem das nanopartículas as candidatas ideais para o desenvolvimento de terapias inovadoras.

Para além do tratamento, as nanopartículas também podem ser extremamente úteis na fase de diagnóstico. O diagnóstico em fase preliminar é possível assim como a aplicação de terapias em estadios muito iniciais <sup>25</sup>.

#### **3.1. Nanopartículas de Ouro**

As nanopartículas de ouro (AuNPs) exibem um grande espectro de formas e propriedades, sendo facilmente manipuladas para servir um propósito específico. A sua síntese é simples, apresentam uma natureza química que permite um leque de opções de funcionalização e têm ainda uma natureza estável. Para além disto, as AuNPs possuem ressonâncias plasmónicas de superfície altamente ajustáveis. A importância desta propriedade passa pela possibilidade das AuNPs absorverem radiação em comprimentos de onda específicos que transformam posteriormente em energia térmica. Isto acontece devido ao facto dos eletrões da orbital-d se encontrarem em ressonância. Quando submetidos a uma radiação com frequência coincidente com a de ressonância, estes eletrões absorvem ou dispersam a radiação.

Nanopartículas com dimensões superiores a 2 nm podem atingir eficiências de 100% no processo de conversão de radiação para energia térmica<sup>26</sup>. Esta característica fototérmica é útil para uma panóplia de aplicações, Figura 3.

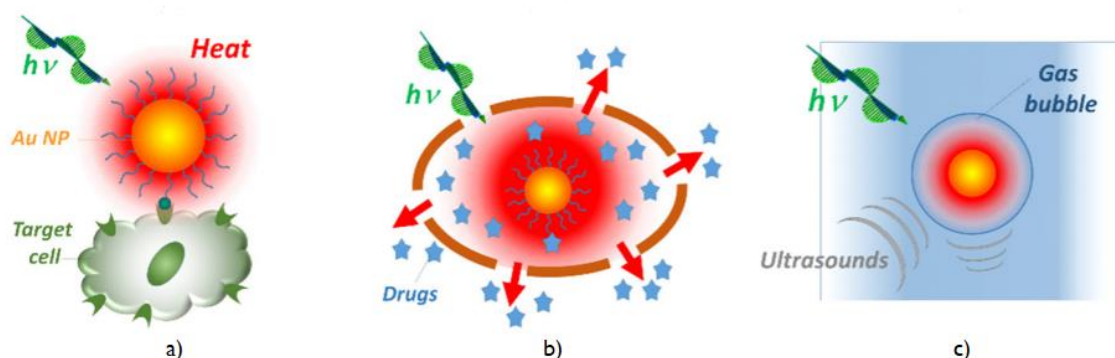


Figura 3 - Aplicações relacionadas com os efeitos fototérmicos. a) destruição de células cancerígenas. b) melhoria na libertação de fármacos. c) formação de nanobolhas para aumento de contraste em exames imagiológicos. Adaptado de <sup>26</sup>.

Atualmente diversas formas e tamanhos de nanopartículas são obtidas de acordo com o método de síntese utilizado. O controlo dos parâmetros que caracterizam esses métodos permitem a obtenção de AuNPs com as particularidades desejadas. Sucintamente, as AuNPs classificam-se como *nanospheres*, *nanorods*, *nanoshells* e *nanocages*. A sua forma aproximada pode ver-se na Figura 4.

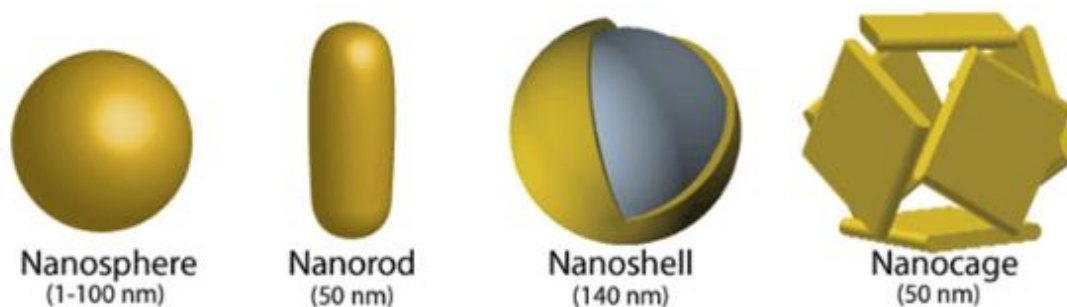


Figura 4 - Diferentes Nanopartículas de Ouro. Adaptado de <sup>27</sup>.

### 3.2. Síntese de Nanopartículas de Ouro

Existem várias alternativas para a síntese das nanopartículas de ouro e duas opções para a classificação dos processos. A primeira opção distingue os métodos entre “*Bottom-Up*” ou “*Top-Down*” e a diferença entre ambas está clara na Figura 5. A segunda classifica-os como físicos, químicos ou biológicos <sup>3</sup>.

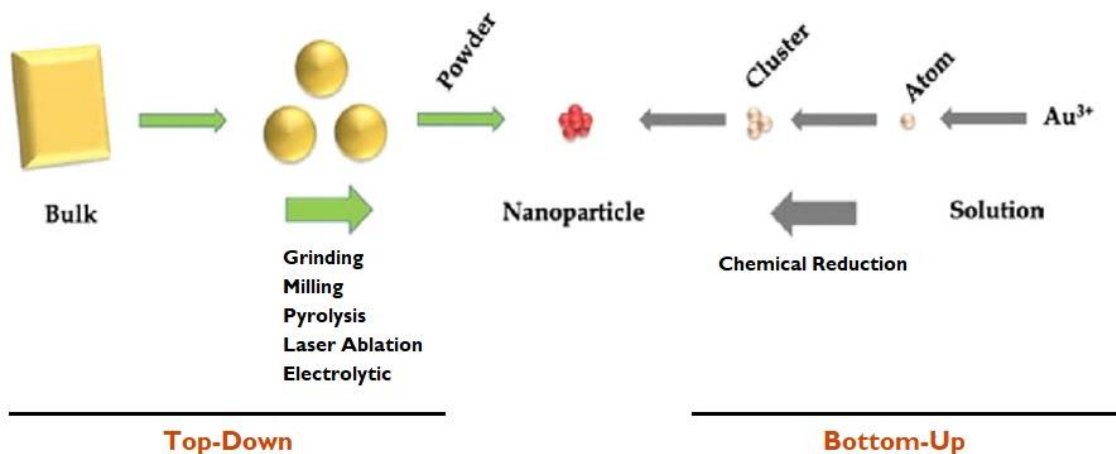
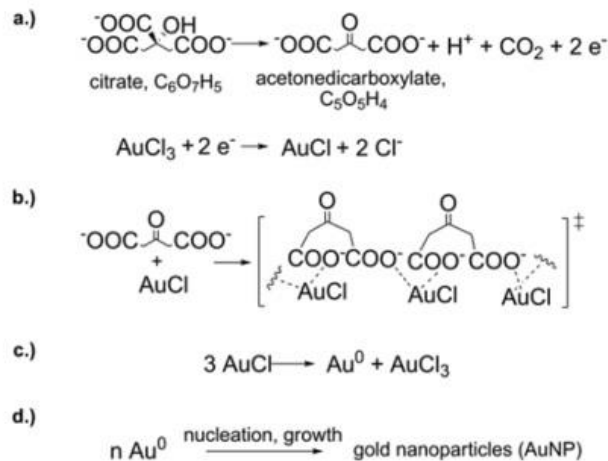


Figura 5 - Processos Top-Down e Bottom-Up. Modificado de <sup>3</sup>.

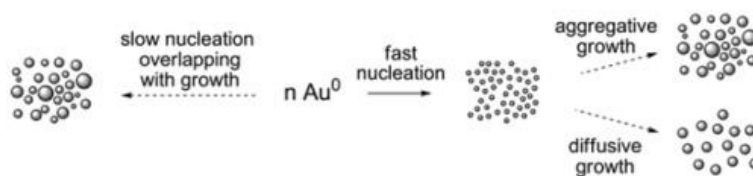
A tendência atual é encontrar processos que permitam um controlo ótimo das características das nanopartículas. Neste aspeto os processos químicos têm-se destacado, não só pelo melhor controlo do tamanho e da morfologia, mas também por serem vantajosos do ponto de vista de simplicidade, de quantidade produzida e económico. São também os métodos químicos os mais utilizados academicamente e alvo de maior foco neste trabalho.

### 3.2.1. Processos Químicos

Quanto aos processos químicos, os mais comuns baseiam-se em reações químicas envolvendo sais de ouro na presença de agentes redutores em meio aquoso, ou seja, em solução. Às nanopartículas de ouro em solução dá-se o nome de ouro coloidal. Em 1951, Turkevich *et al.* <sup>28</sup> desenvolveram um método de síntese que partia da redução de ácido cloroáurico ( $HAuCl_4$ ), Figura 6. O método, designado por método de Turkevich, utiliza citrato de sódio não só como agente redutor, mas também como estabilizador da solução. Deste processo são retiradas nanopartículas esféricas monodispersas em solução aquosa de cor avermelhada. Uma particularidade do método de Turkevich é a alteração de cor da solução desde o momento em que se misturam os reagentes, cor azul-cinzento, até ao produto final de cor avermelhada. O mecanismo do método de Turkevich foi muito bem explicado por Schulz *et al.* <sup>29</sup>.



### nucleation and growth



### pH influence

citrate protonation:



precursor species:

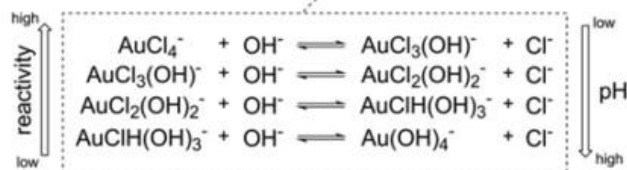


Figura 6 - Mecanismo da síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich e influência do pH. Adaptado de <sup>29</sup>.

De acordo com o trabalho de Schulz e com a Figura 6, a primeira etapa a.) corresponde à reação redução-oxidação do citrato de sódio e o precursor de Au(III), cujos produtos são íons Au(I) e um composto intermédio de importância elevada, dicarboxilato de acetona (ADC). Este composto é responsável por organizar os íons Au(I) em complexos poli moleculares, etapa b.) na figura, resultando numa elevada concentração local destes íons. Em c.) vemos a formação dos monómeros de Au que através de um processo de nucleação d.) formam então as nanopartículas de ouro.

Um mecanismo de crescimento das nanopartículas, quando sintetizadas pelo método de Turkevich, envolvendo quatro etapas foi proposto em 2010 por Polte *et al.*<sup>30,31</sup> que observou todo o crescimento das partículas *in situ*. Com a utilização de tecnologias de observação com raios-X e microscopia eletrónica foi possível a observação de parâmetros como tamanho, forma, estado de oxidação, polidispersão e número de partículas. A conclusão a que chegaram foi então um mecanismo de crescimento em 4 etapas resumido na Figura 7.

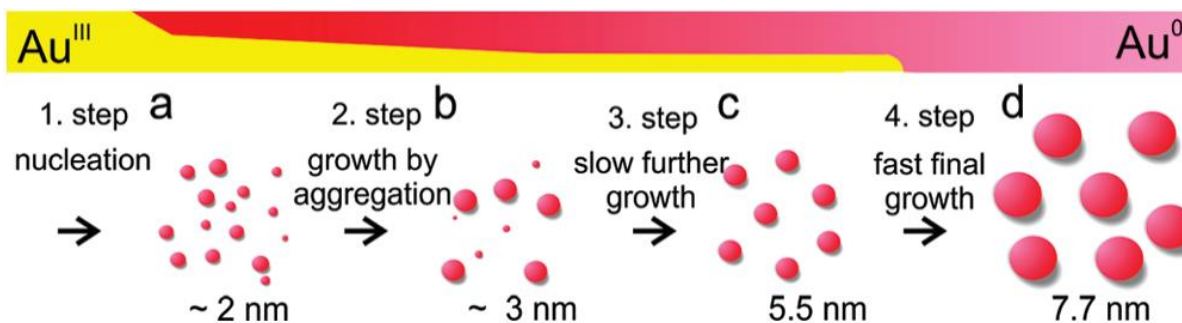


Figura 7 - Mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Turkevich. Adaptado de <sup>30</sup>.

As etapas de crescimento são coincidentes com diferentes taxas de reação de redução. Na primeira etapa a taxa de redução elevada leva ao aparecimento de nanopartículas iniciais com diâmetros de 1 a 2 nm. Com uma diminuição na taxa de redução, na segunda fase as nanopartículas iniciais coalescem pois têm uma baixa estabilidade eletrostática, aumentando para dimensões que rondam os 3 nm. A partir daqui o número de partículas mantém-se, o que se deve ao facto do citrato conferir estabilidade suficiente para impedir agregação. O crescimento acontece agora por difusão, inicialmente lenta (etapa 3) que ocorre de acordo com as taxas de redução dos sais de ouro. Na fase final, quando as partículas atingem diâmetros de aproximadamente 5nm, a difusão rápida deve-se à redução dos iões  $Au(III)$  presentes no restante precursor, na superfície das próprias partículas, atuando estas como catalisadoras. O mecanismo de crescimento acima descrito foi ainda refinado, explicando-se em mais detalhe a química de todas as etapas, e pode ser consultado em Polte *et al.* <sup>32</sup>.

O mecanismo de crescimento é importante para se ter noção de como este poderá ser manipulado de forma a que se pudesse efetuar um controlo sobre o mesmo, de modo a obter nanopartículas com propriedades definidas *a priori*. Modificações a este método surgiram rapidamente, alterando o tempo de reação, o precursor, temperatura ou o agente redutor. Um parâmetro que se revelou essencial foi o pH. O estudo feito por Ji *et al.* <sup>33</sup> concluiu que o pH altera não só o tamanho e a sua distribuição, mas também o próprio mecanismo de crescimento. Ao influenciar a reatividade do precursor (visível na Figura 6) o mecanismo de crescimento divergiu do explicado anteriormente para valores de pH inferiores a 6.5. A Figura

8 ilustra essa alteração. Adicionalmente Ji e os seus colegas relataram que o pH é um parâmetro que permite um controlo do tamanho e da dispersão das nanopartículas. O controlo de tamanho é dependente dos processos iniciais do mecanismo de formação e a estabilidade das nanopartículas que determina a sua não agregação tem de ser controlada.

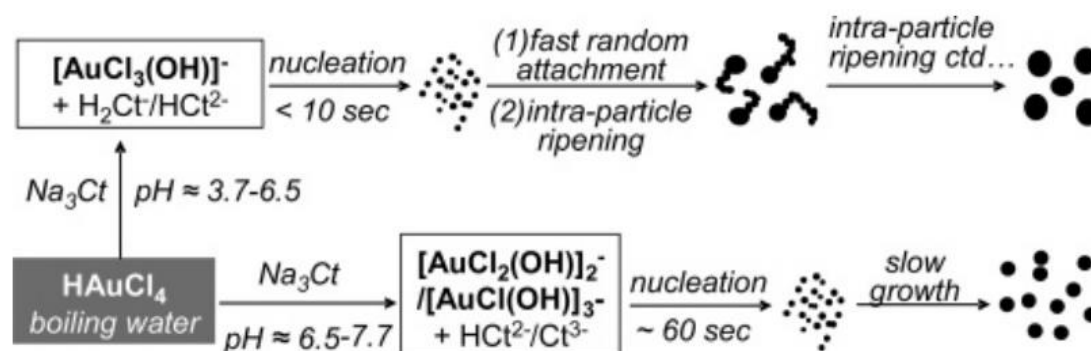


Figura 8 - Influência do pH no mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro. Adaptado de <sup>33</sup>.

Vários estudos demonstraram que um aumento de concentração da espécie intermédia ADC leva a uma nucleação mais rápida e a uma melhor dispersão das nanopartículas, culminando em nanopartículas mais pequenas e com uma distribuição de diâmetros estreita. A concentração deste composto pode ser aumentada pela adição de HAuCl<sub>4</sub> a uma solução de citrato de sódio em ebulição. Designa-se a esta técnica o processo inverso e foi testado experimentalmente por Ojea-Jiménez *et al.* <sup>34</sup>. Outras modificações para obtenção por exemplo de *nanorods* de ouro são visíveis na Tabela I.

Tabela I - Modificações ao método de Turkevich para síntese de nanopartículas de ouro. Adaptado de <sup>35</sup>.

Parâmetro Otimizado	Consequência
Rácio Na <sub>3</sub> Ct para HAuCl <sub>4</sub>	0.4:1 até 2:1 – Tamanho reduzido entre 130 e 30nm.
Rácio Na <sub>3</sub> Ct para HAuCl <sub>4</sub>	0.7:1 até 3.5:1 – Tamanho reduzido até 30nm; Morfologia de Nanowire.
Temperatura	Aumentar a temperatura além dos 100°C provoca redução de tamanho.
pH	pH alcalino favorece a formação de nanopartículas de baixas dimensões e monodispersas.

Outro método muito relevante para a síntese de nanopartículas de ouro foi descoberto por Brust e Schiffrin em 1994 cuja denominação é também a dos seus criadores, Figura 9. Esta



via de síntese permitiu a obtenção de nanopartículas de ouro estáveis em solução e no estado sólido com um controlo de tamanho e polidispersidade eficaz. O método diz-se de duas fases, já que  $\text{AuCl}_4^-$  (contendo iões  $\text{Au}^{3+}$ ) é transferido para uma fase orgânica de tolueno utilizando brometo de tetraetilamônio como catalisador da transferência de fase. Posteriormente, um tiol orgânico (dodecanetiol) é adicionado o que provoca a redução de  $\text{Au}^{3+}$  para  $\text{Au}^{1+}$ . Este tiol orgânico desempenha também a função de agente estabilizador ligando-se à superfície da nanopartícula impedindo a agregação das mesmas. De seguida adiciona-se o agente redutor principal,  $\text{NaBH}_4$  (borohidreto de sódio) ocorrendo então a formação de nanopartículas de ouro <sup>36</sup>.

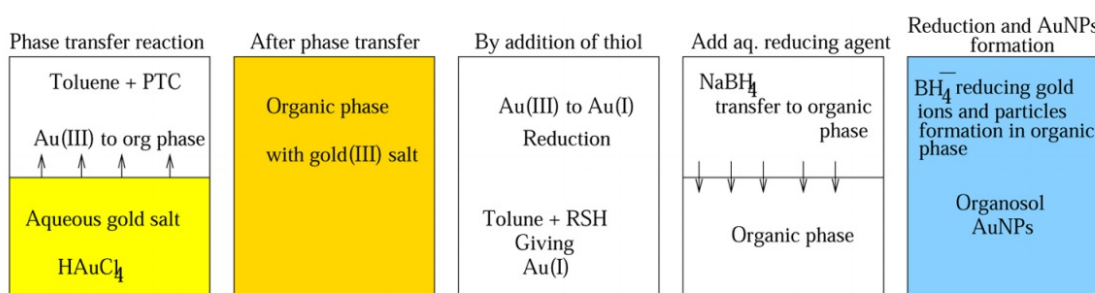


Figura 9 - Representação esquemática do método de Brust-Schiffirin. PTC: Catalisador de transferência de fase. RSH: dodecanotiol. Adaptado de <sup>37</sup>.

O controlo de tamanho das partículas pode ser feito de acordo com a estabilidade das partículas mediada pela quantidade de tiol utilizado, sendo a rapidez do processo de passivização das AuNPs dependente dessa mesma quantidade, Figura 10 <sup>37</sup>. O mecanismo de crescimento difere um pouco do descrito para método de Turkevich, devido a uma redução mais rápida utilizando  $\text{NaBH}_4$  e não citrato de sódio.

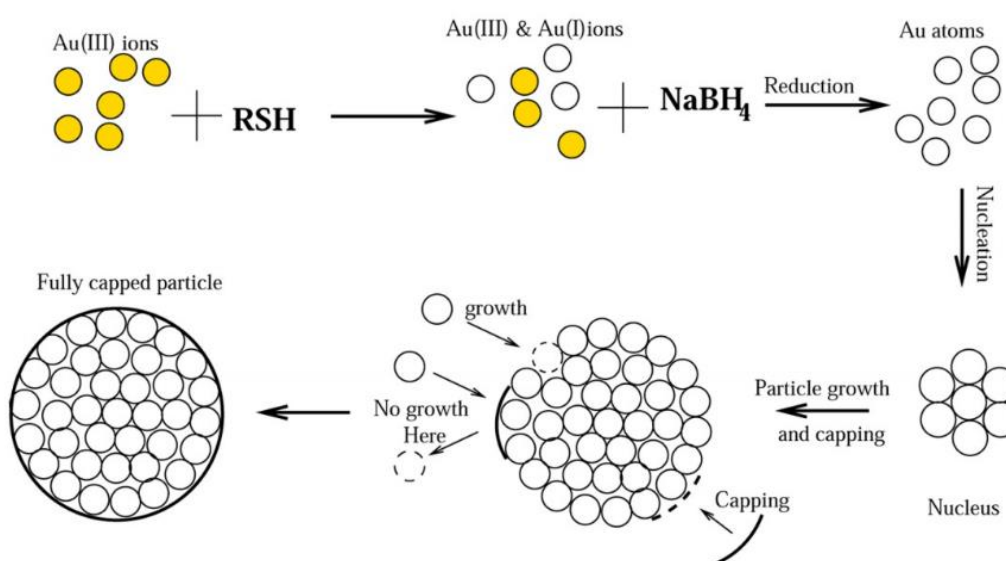


Figura 10 - Mecanismo de crescimento das nanopartículas de ouro sintetizadas pelo método de Brust-Schiffirin. Adaptado de <sup>37</sup>.

O melhor método para formação de nanopartículas de formas não esféricas, tais como *nanorods* e *nanoshells*, é baseado na utilização de partículas semente preparadas anteriormente que são posteriormente reduzidas por um agente redutor fraco na presença de agentes de direcionamento estrutural <sup>38</sup>.

### **3.2.2. Outros Processos**

Processos físicos para síntese de AuNPs envolvem a utilização de micro-ondas e ultrassons, redução eletroquímica e fotoquímica e a ablação por laser. Estes processos são muitas vezes morosos e caros. Por outro lado, os processos químicos utilizam reagentes tóxicos, tais como agentes redutores ou estabilizadores, que comprometem as aplicações dessas mesmas nanopartículas especialmente na área da biomedicina <sup>39</sup>.

Posto isto, a evolução tem sido no sentido de encontrar métodos que não comprometam o ambiente, métodos estes designados por biológicos que não empregam reagentes tóxicos. A síntese é feita por microrganismos, enzimas, plantas ou extratos de plantas <sup>40</sup>. No Anexo 2 está disponível uma tabela com diferentes possibilidades para a síntese biológica de nanopartículas de ouro com características diversas.

### **3.3. Funcionalização e vectorização**

Para além das propriedades únicas das nanopartículas de ouro, outro fator chave que determina o que ocorre com as mesmas após a sua administração é a sua funcionalização. As modificações de superfície têm impacto significativo na biodistribuição e toxicidade das nanopartículas. Para além de atuarem como estabilizadores, impedindo a sua agregação, os modificadores fornecem as nanopartículas uma melhor biocompatibilidade e vectorização específica. Têm ainda efeito no tempo de semivida na circulação sanguínea, ao evitar que sejam removidos pelo sistema reticuloendotelial antes de atingirem o alvo pretendido. As nanopartículas de ouro não funcionalizadas ligam-se a proteínas existente no sangue formando complexos que são reconhecidos pelo sistema imunitário acabando por ser fagocitadas de maneira precoce <sup>41</sup>.

A funcionalização pode ser feita de duas formas, por adsorção ou através de ligações covalentes entre os ligandos e os átomos de ouro <sup>38</sup>. Existe um largo leque de compostos passíveis de serem utilizados para a funcionalização de nanopartículas de ouro e encontra-se no Anexo 3 uma tabela extensiva destes compostos e as respetivas aplicações. Apesar do largo espectro de opções, destaca-se o polietilenoglicol (PEG) por ser um dos mais comuns e amplamente utilizados. Este ligando estabelece ligações covalentes com os átomos superficiais da nanopartícula e é utilizado por si só ou como intermediário para funcionalização de outros

compostos. A funcionalização de AuNPs com PEG é útil para fazer um direcionamento das mesmas para organismos celulares ou intracelulares. A internalização e biodistribuição das nanopartículas de ouro conjugadas com PEG depende intensamente das suas características <sup>42</sup>. O estudo conduzido por Zhang <sup>43</sup> demonstrou que a internalização das nanopartículas estava diretamente relacionada com o seu diâmetro. Observaram que menores dimensões, na ordem dos 20 nm, permitiam camadas mais densas de PEG e, conseqüentemente, uma melhor internalização. As partículas com diâmetros superiores, cerca de 80 nm, eram rapidamente expulsas.

Outros compostos podem ser usados, tais como aminoácidos, peptídios, oligonucleótidos, proteínas e anticorpos específicos. Outras modificações que aparentemente são inertes influenciam drasticamente a acumulação das AuNPs nos diversos órgãos. Portanto, quando se trata de AuNPs para aplicações anticancerígenas, para além das propriedades de vectorização é necessário ter em atenção a potencial acumulação de partículas para as diferentes partes do corpo <sup>38</sup>.

Todo o processo de síntese e de funcionalização das nanopartículas de ouro é crucial para obter uma terapia eficiente. O objetivo principal é obter uma especificação de células alvo cada vez mais precisa e consistente, ou seja, fazer uma vectorização da nanopartícula. Existem essencialmente dois modos distintos de fazer essa vectorização, denominados de passivo e ativo, Figura 11.

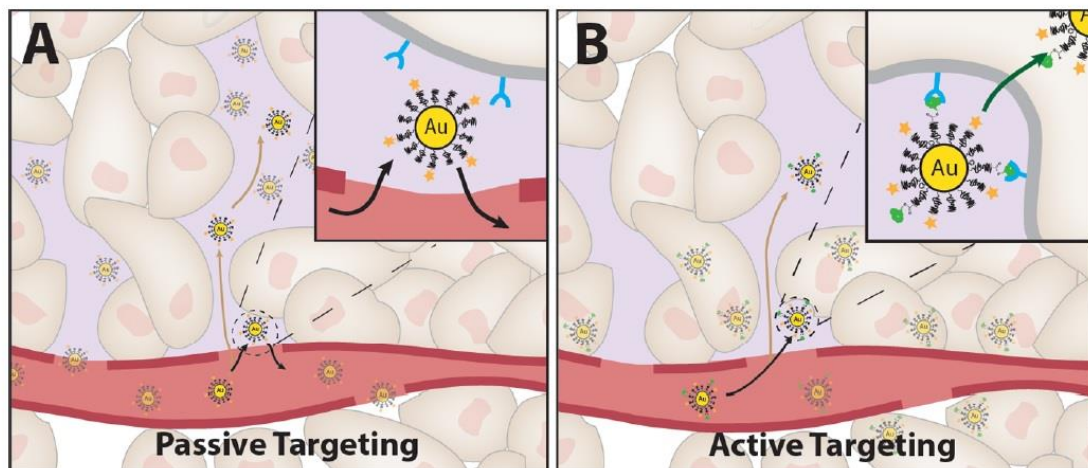


Figura 11 - Diferentes mecanismos de vectorização. A- Vectorização passiva; B- Vectorização ativa. Adaptado de <sup>44</sup>.

A vectorização passiva está relacionada com o efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR). Quando um tumor atinge uma certa dimensão a vasculatura presente no meio que o envolve não é suficiente para sustentar o seu crescimento. Deste modo, é desencadeado um processo de angiogénese através do qual se formam novos vasos. Porém,

os vasos formados são extremamente irregulares, com epitélio comprometido e membranas deficientes, resultando em pequenas janelas com dimensões entre 200 e 2000 nm. As dimensões dependem das características do tumor, no entanto, oferecem pouca resistência à passagem das nanopartículas da vasculatura para o meio intersticial do tumor e daí a permeabilidade aumentada. Acrescenta-se a este efeito o facto de para tecidos tumorais não existir uma drenagem linfática constante como ocorre nos tecidos normais. Como resultado as nanopartículas sofrem acumulação no meio intersticial do tumor sem que sejam convetadas de novo para a circulação sanguínea, ficando então retidas. Apesar de estudado pela ciência, este efeito nos humanos padece ainda de investigação principalmente no que toca a vectorização de nanopartículas. As características físico-químicas das partículas são tão importantes quanto as características do tumor para se obter uma exploração significativa deste efeito. O EPR afeta a distribuição das nanopartículas de ouro permitindo um acesso facilitado ao meio tumoral, contudo não serve de garantia que o alvo farmacológico é atingido e, caso seja, que seja atingido da forma desejada <sup>45</sup>.

A vectorização ativa, ou vectorização mediada por ligandos, baseia-se na funcionalização da superfície das nanopartículas com ligandos que serão reconhecidos pelo seu substrato alvo. Os ligandos são assim seleccionados para se ligarem a moléculas ou recetores em sobreexpressão nas células tumorais. O objetivo desta metodologia é aumentar e especificar as interações entre os conjugados nanopartículas-ligando e o alvo farmacológico. As interações são também aumentadas pelo facto de a uma nanopartícula se poderem conjugar várias cópias do ligando. A eficiência de sistemas de vectorização ativa é avaliada segundo dois parâmetros, a especificidade e a capacidade de entrega. A especificidade é avaliada de acordo com a biodistribuição do conjugado e as suas interações com células não alvo. A capacidade de entrega relaciona-se com o design e as propriedades da nanopartícula. A vectorização ativa beneficia ainda da vectorização passiva ou do efeito de EPR, sendo vista como complementar da mesma <sup>45</sup>.

No caso do cancro da mama, a sobreexpressão do HER-2 é particularmente útil como explicito nos subcapítulos seguintes.

### **3.4. Aplicações no diagnóstico**

As nanopartículas de ouro podem ser utilizadas com sucesso no diagnóstico precoce do cancro da mama através de exames de imagiologia. Ao contrário da tomografia axial computadorizada (TAC) ou ressonância magnética (RM), onde apenas tumores de dimensões superiores a poucos milímetros são detetados, a utilização de AuNPs permite baixar esse

limite de deteção ou até mesmo tirar partido das suas propriedades para outras técnicas baseadas na sua capacidade de dispersão de luz <sup>41</sup>.

As técnicas de raios-X, tal como a mamografia, são as mais utilizadas no diagnóstico do cancro. As nanopartículas de ouro possuem uma atenuação de raios-X elevada, superior à dos elementos naturais encontrados no corpo humano. Assim sendo, é possível a utilização de nanopartículas de ouro funcionalizadas como agente de contraste, obtendo uma excelente diferenciação entre células cancerígenas e saudáveis <sup>46</sup>. Hainfeld *et al.* <sup>47</sup> conjugou nanopartículas de ouro com PEG e anticorpos específicos para HER-2 no sentido de realçar estas células. Verificou-se um aumento significativo no contraste entre as células tumorais e os tecidos circundantes, permitindo a visualização de tumores pequenos em imagens obtidas com raios-X.

Outra técnica de diagnóstico que pode beneficiar do uso de nanopartículas de ouro é a imagem fotoacústica. O princípio de funcionamento assenta na geração de ondas acústicas devido à expansão térmica dos materiais. Sob ação de um laser pulsado, os materiais em expansão térmica periódica emitem ondas acústicas que são detetadas e utilizadas para a construção de uma imagem. Mais uma vez, devido às excelentes propriedades óticas das nanopartículas de ouro assim como a sua eficiência na transformação de radiação em energia térmica, as AuNPs podem ser utilizadas nesta metodologia de diagnóstico. <sup>46</sup>

### **3.5. Aplicações no tratamento**

Tal como já foi referido, as nanopartículas de ouro têm características particulares que lhes conferem um enorme potencial no desenvolvimento de terapias eficazes contra o cancro. Para além do diagnóstico, as AuNPs têm sido largamente estudadas para aplicação no tratamento fototérmico, para melhoria do transporte e entrega de fármacos citotóxicos, como adjuvantes na quimioterapia e radioterapia e ainda na modulação de fatores importantes no crescimento tumoral. Vários estudos em linhas celulares e *in vivo* têm sido desenvolvidos com grande sucesso.

#### **3.5.1. Terapia Fototérmica**

Devido às propriedades já acima mencionadas, nomeadamente a ressonância plasmónica de superfície, as nanopartículas de ouro têm um potencial elevado para aplicação de terapia fototérmica.

A ideologia por trás desta terapia está na destruição das células tumorais por elevadas temperaturas. O aumento de temperatura, quer local quer do corpo inteiro, advém do uso

de radiação eletromagnética e, em ambos os casos, causa rotura das membranas celulares e desnaturação das proteínas resultando na morte celular, Figura 12.

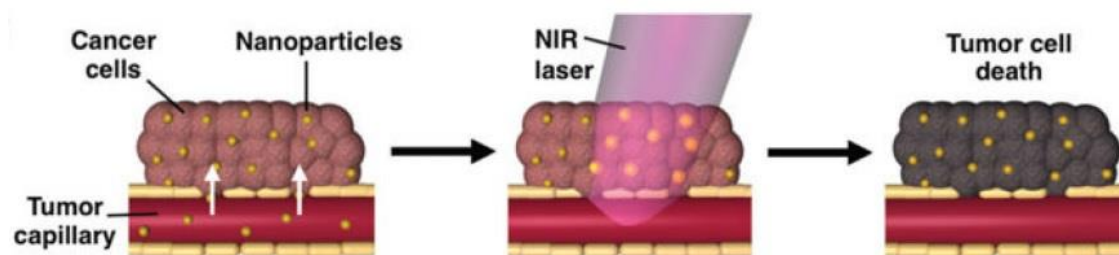


Figura 12 - Ilustração da morte celular por terapia fototérmica. Adaptado de <sup>48</sup>.

A terapia fototérmica no seu estado base, sem aplicação de nanopartículas e com uso de radiação na gama visível, sofre de uma desvantagem crítica ao apresentar baixa especificidade, isto é, não faz distinção entre tecidos e pode resultar em danos nos tecidos saudáveis. Esta desvantagem foi parcialmente ultrapassada com a introdução de radiação laser que melhorou significativamente o controlo e a precisão deste processo. Para além da especificidade, também a eficiência do processo tem vindo a ser aumentada, com maior percentagem de energia de radiação transformada em energia térmica muito por via da utilização de nanocompostos <sup>46</sup>.

Neste contexto, as nanopartículas de ouro apresentam um conjunto de características que as destacam. Têm capacidade de absorver dentro de um elevado espectro de radiação (desde ultravioleta até próximo do infravermelho) e uma área de absorção elevada quando comparado com os compostos utilizados regularmente. Isto permite a utilização tanto de menores potências como de tempos menores de exposição. Utilizando conjugados de nanopartículas de ouro, Huang *et al.* <sup>49</sup> demonstraram nos seus estudos que a potência de laser necessária para induzir morte celular pode mesmo ser reduzida para metade.

As diferentes morfologias de nanopartículas de ouro mencionadas na Figura 4 são utilizadas na terapia fototérmica. A importância da morfologia da partícula reside no facto de esta influenciar o seu pico de absorção. No geral, existem duas janelas de comprimentos de onda próximos do infravermelho onde é desejável ter os picos de absorção, a primeira entre os 650 e os 850 nm e a segunda entre os 950 e os 1350 nm. O porquê de estas serem as gamas desejáveis compreende-se pelo facto de radiações com estes comprimentos de onda penetrarem em tecidos saudáveis sem danos causados, atingindo as nanopartículas incorporadas nas células tumorais. A maioria das AuNPs são desenhadas para operar na primeira janela o que implica o uso de cateteres em tumores profundos (na ordem dos cm). A segunda janela é atualmente a maior promessa nesta área, com expectativas de penetração que rondam os 10 cm, contando, no entanto, com menos estudos acerca da sua aplicação e

combinação com outras terapias comparativamente com a primeira janela. Para além da particularidade de absorverem radiação na região próxima do infravermelho, as nanopartículas de ouro primam pela sua eficiência na conversão de energia de radiação para térmica. Neste campo destacam-se as nanopartículas não-esféricas ou as esféricas de baixos diâmetros <sup>48</sup>.

Por outro lado, o tamanho e a forma da nanopartícula influenciam a sua capacidade de saída dos veios sanguíneos e de penetração dos tumores, condicionando ultimamente o sucesso da terapia. Perrault *et al.* <sup>50</sup> efetuou um estudo da capacidade penetração de nanopartículas esféricas de 20, 60 e 100 nm de diâmetro. A conclusão retirada foi que as partículas com menor diâmetro emitiam mais sinal a distâncias maiores dos vasos sanguíneos, provando então que o aumento de diâmetro limita a sua penetração. No entanto, o tempo de retenção celular das partículas pequenas é reduzido, fazendo com que seja necessário encontrar um ponto ótimo de equilíbrio entre penetração e retenção tendo em conta características do tumor.

O mecanismo de morte celular é importante e com o controlo de parâmetros da terapia fototérmica é possível induzir necrose ou apoptose em específico. Irradiações com elevadas energias tendem a iniciar processos de necrose nas células. Apesar da eficácia na destruição de tumores, efeitos secundários indesejados podem surgir como por exemplo a libertação de compostos celulares que provocam inflamação e potenciam a formação de tumores secundários. Irradiações de mais baixa energia dão início a processos de apoptose que desencadeiam respostas imunogénicas favoráveis. <sup>51</sup>

A terapia fototérmica pode ainda ser conjugada com quimioterapia, regulação de genes e imunoterapia para abordagens sinérgicas ao tratamento do cancro.

Testes *in-vitro* confirmaram a melhoria da terapia fototérmica quando utilizada com nanopartículas de ouro. O estudo realizado por Hirsch *et al.* <sup>52</sup> experimentou o tratamento de células do cancro da mama incubadas com e sem nanopartículas de ouro utilizando um laser de 820 nm. Concluiu que a taxa de sobrevivência celular era menor na presença das nanopartículas de ouro. Também em 2006, Lowery *et al.* <sup>53</sup> aplicaram terapia fototérmica com introdução de nanopartículas conjugadas com anticorpos específicos dirigidos ao HER-2 em células do cancro da mama. Os resultados comprovaram mais uma vez a eficácia da utilização de fototerapia com nanopartículas de ouro, mencionando ainda a extrema importância de existir uma vectorização ativa eficaz.

### **3.5.2. Radioterapia**

Devido ao número atómico elevado do ouro, as nanopartículas de ouro podem também ser usadas como agentes de sensibilização à radiação, produzindo um efeito

quantitativo de aumento de dose. Este efeito advém do incremento de absorção da radiação ionizante providenciado pela presença das nanopartículas de ouro e da sua produção de elétrons secundários por efeito de Auger que desencadeiam a formação de espécies muito reativas de oxigênio. Estas espécies causam danos adicionais ao DNA das células e ainda nas membranas e mitocôndrias potenciando o efeito da radiação. O aumento da dose de radiação pode ser crucial no tratamento de pacientes com cancro da mama metastizado, especialmente em pacientes onde após cirurgia não conservadora, é necessária uma segunda irradiação devido a uma recorrência <sup>54</sup>.

Hainfeld *et al.* <sup>55</sup> foi o primeiro a aproveitar-se das propriedades das nanopartículas de ouro para aumentar os efeitos terapêuticos da radiação em ratos com carcinoma da mama. O grupo de ratos contendo as células tumorais, foi injetado com 2,7 g de AuNPs por kg e posteriormente bombardeados com uma radiação com 250 kV de pico. Comparando com o grupo de controlo, sem nanopartículas de ouro, não só os tumores tinham menores dimensões como a taxa de sobrevivência após um ano aumentou com o uso das nanopartículas. Apesar de radiações na ordem dos kV não serem utilizadas para terapêutica, outro estudo provou o efeito de melhoria em linhas de células MDA-MB-231 mamárias com carcinoma utilizando radiação na ordem dos MV<sup>56</sup>.

### **3.5.3. Drug Delivery**

Dado que as nanopartículas de ouro possuem uma área de superfície elevada e propriedades como EPR a possibilidade de as conjugar a agentes terapêuticos para a formação de sistemas de libertação de fármacos é elevada. Estes sistemas permitem melhorar significativamente a especificidade e a eficiência do transporte dos agentes contrariando as limitações das terapias atuais.

Os compostos conjugados devem possuir um leque de características particulares como:

- Transportar quantidades adequadas de fármacos;
- Ultrapassar mecanismos de resistência;
- Melhorar a biodistribuição;
- Prevenir a rápida eliminação dos agentes terapêuticos.

O fármaco pode ser ligado ao nanotransportador quer através de encapsulação quer por uma ligação química. Esta última opção permite o uso de um pró-fármaco, isto é, o agente terapêutico apenas fica na forma ativa quando se encontra no meio tumoral. Tira assim partido de divergências patológicas e fisiológicas entre células malignas e saudáveis, tais como o pH ou a sobre-expressão de alguns componentes, para ativar o composto nas células alvo. As



propriedades físicas das nanopartículas entram também em destaque neste campo, uma vez que a libertação ou ativação do agente terapêutico pode ser feita através de estímulos externos <sup>38</sup>.

A fototerapia, para além de constituir uma terapêutica por si só, pode ser utilizada para melhorar o transporte e libertação de fármacos. O aumento de temperatura, ou hipertermia, aumenta a permeabilidade vascular, das membranas celulares e da matriz extracelular, permitindo assim que haja um aumento da concentração de fármaco intratumoral e intracelular <sup>57</sup>. Para além disso, a citotoxicidade do fármaco pode ser aumentada, como comprovado por You *et al* <sup>58</sup> em 2012. No seu estudo concluiu que, comparando doxorubicina e doxorubicina lipossômica com doxorubicina conjugada com *nanoshells* de ouro estimuladas por um laser próximo do infravermelho, as últimas eram mais citotóxicas para células do cancro da mama *in vitro* e potenciavam a erradicação do tumor *in vivo*. Outro estudo que comprova a viabilidade da conjugação de agentes terapêuticos com nanopartículas de ouro foi feito por Wang e os seus colegas <sup>59</sup>, onde também conjugaram doxorubicina com nanopartículas de ouro para o tratamento de cancros mamários metastizados. Com o seu trabalho concluíram que, devido a uma melhoria na absorção celular, as nanopartículas com doxorubicina induzem apoptose celular de maneira mais eficiente. Isto combinado com a irradiação por laser culminou na redução do tumor primário assim como a supressão do crescimento das metástases distantes.

A conjugação de propriedades químicas e físicas das AuNPs com as características tumorais e celulares permite um controlo do perfil e do local de libertação de agentes terapêuticos, apresentando-se como um excelente candidato para transporte de fármacos e permitindo uma especificidade no tratamento do cancro impensável para as terapias mais comuns.

No tratamento do cancro da mama em que as células apresentam sobreexpressão de HER-2, é com base nesta característica diferenciadora que se aplicam terapêuticas dirigidas. O anticorpo monoclonal Trastuzumab é específico para o HER-2 e a sua combinação com nanopartículas de ouro traz duas vantagens. Leva ao aumento de absorção já discutido, e por outro lado contraria a resistência que se pode verificar ao anticorpo <sup>54</sup>.

#### **3.5.4. Inibição da Angiogénese**

A inibição da angiogénese com o uso de AuNPs é uma das estratégias mais promissoras no tratamento do cancro. Este processo consiste no crescimento e na expansão de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, onde ocorre não só degradação da matriz extracelular, mas também ativação, migração, proliferação e diferenciação das células

endoteliais. As células cancerígenas produzem compostos que ativam as células endoteliais, propiciando a ocorrência deste processo <sup>60</sup>.

Na fase inicial de crescimento de tumor, até dimensões de 1 a 2 mm, processos difusivos são suficientes para sustentar as células tumorais. No entanto, o crescimento de um tumor é dependente do seu volume seguindo uma lei sigmoide. Aumentando a dimensão do tumor, aumentam as suas necessidades e a vasculatura do tumor torna-se essencial para o seu crescimento. As células tumorais desencadeiam então processos de angiogénese, dos quais depende o seu crescimento já que a formação de vasos sanguíneos permite um fluxo de nutrientes e oxigénio assim como uma via de eliminação de toxinas metabólicas. Os principais alvos para a inibição da angiogénese consistem num grupo de fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e, o mais importante, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Estes fatores de crescimento são notórios ativadores de angiogénese ocorrendo uma sobre-expressão dos mesmos durante o crescimento e a metástase dos tumores <sup>38</sup>.

Nanopartículas de ouro não funcionalizadas interagem com alguns dos fatores de crescimento mencionados em cima, tais como FGF e VEGF165. Através desta interação impedem estes compostos de chegar aos seus recetores inibindo o processo de angiogénese <sup>38</sup>.

Estudos comprovam que bioflavonoides como o quercetin têm efeitos que retardam o processo de carcinogénese. O quercetin tem sido alvo de estudos recentes que o identificam como um potente agente terapêutico contra o cancro ao desempenhar um papel importante na modulação da proliferação, sobrevivência e diferenciação das células tumorais. Balakrishnan e os seus colegas <sup>61</sup> foram os primeiros a explorar a viabilidade da aplicação do quercetin no tratamento do cancro da mama. Sendo um composto insolúvel em meio aquoso, os autores do estudo criaram um conjugado de quercetin e nanopartículas de ouro para explorar o seu efeito no crescimento e na metastização do cancro da mama. O estudo foi feito em células MCF-7 e MDA-MB-231 e concluiu que de facto houve uma redução significativa da expressão de VEGF-2, impedindo que desencadeie mecanismos de angiogénese e crescimento tumoral. Constataram ainda que o conjugado quercetin-AuNPs promove a inibição de processos de transição epitelial-mesenquimal (EMT) importantes na metastização do cancro.

A inibição de angiogénese, sendo promissora, acarreta efeitos adversos que condicionam a atuação de outras terapias. A redução na vascularização implica inevitavelmente uma perda na capacidade de transporte e libertação de fármacos para além da possibilidade de criação de mecanismos de resistência.

### 3.5.5. Toxicidade

Com o crescente desenvolvimento da nanotecnologia e a sua ampla aplicação no campo biomédico, surgiram as preocupações relativamente à sua toxicidade. Consequentemente, vários estudos foram realizados com o objetivo de identificar as interações entre AuNPs com diferentes parâmetros físico-químicos e o sistema biológico, avaliando a ocorrência de efeitos tóxicos. Ouro no seu estado puro é um elemento inerte e não reativo, no entanto, para nanoescalas as propriedades são alteradas e é necessário obter informação detalhada através de estudos, principalmente quando a aplicação é dirigida a sistemas biológicos como é o caso.

Até à data, existem conclusões divergentes quanto à toxicidade das nanopartículas de ouro. Enquanto alguns grupos caracterizam as AuNPs como não tóxicas, outros afirmam que estas podem apresentar toxicidade. Este facto é aceitável e compreensível, uma vez que diferenças nas dimensões, formas, modificadores de superfície e métodos de síntese das AuNPs, nas linhas e modelos celulares, vias de administração, tempos de exposição, etc. inevitavelmente vão fazer variar os resultados<sup>62</sup>.

Um estudo *in vivo* liderado por De Jong <sup>63</sup> em modelos animais determinou qual a influência da dimensão de nanoesferas de ouro na distribuição pelos órgãos. Partículas com diâmetros de 10, 50, 100 e 250 nm foram injetadas por via intravenosa em ratos. Após 24h, a quantidade de ouro presente no sangue e nos tecidos foi analisada. As nanopartículas de 10 nm de diâmetro foram encontradas em todos os tecidos (fígado, baço, rim, testículos, coração, timo, pulmão e cérebro), enquanto que as de dimensões superiores foram apenas encontradas no sangue, fígado e baço. Conclui-se que a dimensão afeta a distribuição das partículas pelos tecidos e que as de menores dimensões têm essa distribuição mais alargada. Zhang *et al.* <sup>64</sup> realizou um estudo parecido com o anterior, utilizando nanopartículas funcionalizadas com PEG. As suas conclusões diferem das anteriores, ao mostrar que as nanopartículas funcionalizadas com PEG de menores dimensões não são as mais tóxicas. Sadauskas *et al.* estudaram os efeitos a longo prazo das nanopartículas de ouro no fígado de ratos. Injetando nanopartículas com 40 nm de diâmetro, após 24h mais de 60% da quantidade injetada encontrava-se nas células Kupffer do fígado. Os autores indicam que estas são essenciais no processo de remoção das nanopartículas da circulação. Observaram também que o processo de eliminação é um processo a longo prazo, acabando estas por ficar encapsuladas em vesículas no fígado, com uma queda no conteúdo acumulado de 9% entre o primeiro dia e o sexto mês. Wang *et al.* <sup>65</sup> ao fazer um estudo das diferentes morfologias de nanopartículas de ouro para tratamento fototérmico do cancro da mama, avaliaram também

a sua biodistribuição e toxicidade, concluindo que a forma e a funcionalização das AuNPs afetam claramente estes dois parâmetros.

As *nanorods* são um caso particularmente interessante. Uma vez que são normalmente sintetizadas usando brometo de cetrimónio (CTAB) como estabilizador, um composto já conhecido como tóxico. O estudo feito por Wang *et al.* <sup>66</sup> comprova que removendo excesso de CTAB dos *nanorods* produzidos reduz a toxicidade das nanopartículas, concluindo que a toxicidade se deve ao composto CTAB e não as nanopartículas em si. Yasuyuki *et al.* substituíram o CTAB por PEG na síntese de *nanorods*, atingindo uma toxicidade menor com esta alteração <sup>67</sup>.

Para avaliar a toxicidade das nanopartículas de ouro quando administradas em doses repetidas, Lasagna-Reeves e os seus colegas <sup>68</sup> realizaram a seguinte experiência. Durante 8 dias, foram administradas doses de 40, 200 e 400 µg/Kg/dia de nanopartículas de ouro com 12,5 nm de diâmetro em ratos. Do seu trabalho, observaram que os níveis de ouro no sangue não aumentaram de acordo com a dose administrada, no entanto, houve um aumento de quantidade proporcional com a dose nos tecidos. Caracterizaram ainda as nanopartículas como não tóxicas, uma vez que não houve quaisquer anomalias físico-patológicas nos ratos.

Mais estudos devem ser feitos para entender como as propriedades das nanopartículas afetam a sua interação com os sistemas biológicos, assim como para avaliar efeitos a longo prazo.

#### **4. Perspetivas futuras**

As nanopartículas de ouro são uma promessa para o desenvolvimento da imagiologia e do tratamento do cancro da mama. Na sua larga maioria, os tumores da mama localizam-se relativamente perto da superfície da pele, o que os torna de fácil acesso e permite o seu tratamento com lasers NIR, mesmo tendo em conta a penetração reduzida destas radiações. Por outro lado, para o cancro da mama a injeção intratumoral é uma forte possibilidade para administração das AuNPs em alternativa à introdução por via intravenosa, uma vez que estudos comprovam que maior percentagem de nanopartículas são acumuladas quando administradas deste modo.

O uso de terapias que envolvem nanopartículas de ouro é benéfico tanto para diagnóstico e tratamento de tumores em estadios iniciais, como também para tumores em estadio avançado, oferecendo um controlo paliativo da doença.

Outra das grandes possibilidades de aplicação assenta no aumento de contraste nos exames imagiológicos mencionado anteriormente, especialmente a sua introdução na mamografia.

A utilização de técnicas de visualização de nanopartículas de ouro em tempo real durante uma cirurgia pode ser extremamente útil na eliminação de margens positivas. O desafio encontra-se na acumulação específica nos tecidos tumorais, já verificada em estudos, mas ainda por aplicar na prática.

Para o cancro da mama é particularmente importante conseguir fazer uso de terapias o menos invasivas possíveis, não só para preservar a estética, mas também de modo a evitar complicações pós-operatórias. A terapia hipertérmica, aproveitando a excelente conversão radiação-calor das AuNPs, ainda não passa de uma solução experimental, no entanto pode muito bem vir a ser uma terapia de sucesso no futuro.

Para além disto, as AuNPs podem ajudar a ultrapassar alguns desafios dos tratamentos atuais. Potenciais vantagens incluem o aumento da dose de radiação ou o uso da terapia fototérmica em tumores recorrentes <sup>69</sup>.

## **5. Conclusão**

O cancro constitui o maior problema de saúde atualmente e encontrar terapias inovadoras e eficazes é prioridade para a comunidade científica. Liderando a tabela de novos casos por ano em Portugal, o cancro da mama é um dos mais preocupantes no sexo feminino acarretando uma componente psicológica importante.

A nanomedicina tem surgido nos últimos anos como uma forte candidata ao desenvolvimento de novos tratamentos, quer terapias completamente inovadoras quer em conjugação com as atuais. Neste campo destacam-se as nanopartículas de ouro pelas suas excelentes propriedades, nomeadamente a ressonância plasmónica de superfície, a elevada eficiência de conversão de radiação para energia térmica, a possibilidade de serem facilmente modificadas e ligadas a outros compostos, a sua excelente absorção e potencialmente a sua toxicidade reduzida.

Todas estas características suscitaram um grande interesse nestes materiais e levaram a que se comesçassem a desenvolver ensaios *in vitro* e *in vivo* para explorar a viabilidade da sua aplicação. Até à data, confirmou-se o potencial para aplicação na terapia fototérmica, em conjugação com quimioterapia e radioterapia melhorando estas terapias, e em especial, para fazer uma especificação precisa entre tecidos saudáveis e tumorais.

A longo prazo e para o futuro é importante estudar a exequibilidade destes tratamentos em humanos, uma vez que há diferenças nos sistemas biológicas e a biodistribuição e toxicidade podem divergir.

## 6. Bibliografia

1. BRAY, Freddie *et al.* - Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**. ISSN 1542-4863. 68:6 (2018) 394–424.
2. ORGANIZATION, World Health - **The Global Cancer Observatory**.
3. ELAHI, Narges; KAMALI, Mehdi; BAGHERSAD, Mohammad Hadi - Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. **Talanta**. ISSN 0039-9140. 184:2018) 537–556.
4. **Cancro da Mama** - [Consult. 10 fev. 2019]. Disponível em <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama/>
5. MARQUES, Laura - Cancro da Mama. **Rev Port Clin Geral**. ISSN 08712379. 19:19 (2003) 9–12.
6. OLIVEIRA P; CARDOSO P; ORVALHO D; ANDRÉ D; SOUSA D; BRAGA D ET AL - Recomendações nacionais para diagnóstico e tratamento do cancro da mama 09. 2016).
7. **Breast Cancer** - [Consult. 24 mai. 2019]. Disponível em <https://www.mskcc.org/cancer-care/types/breast/anatomy-breast>
8. IRA J BLEIWEISS, MD - **Pathology of breast cancer**, atual. 2019. [Consult. 10 mai. 2019]. Disponível em [https://www.uptodate.com/contents/pathology-of-breast-cancer?search=Pathology of breast cancer&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1#H1220079795](https://www.uptodate.com/contents/pathology-of-breast-cancer?search=Pathology%20of%20breast%20cancer&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1#H1220079795)
9. ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. - Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**. ISSN 0309-0167. 19:5 (1991) 403–410.
10. SMITH, Benjamin D. - Breast Cancer: Postmastectomy Radiation, Locally Advanced Disease, and Inflammatory Breast Cancer. Em **Clinical Radiation Oncology**. 4th. ed. [S.l.] : Elsevier, 2016 Disponível em <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323240987000642>>. ISBN 9780323240987. p. 1329-1344.e2.
11. SØRLIE, T. *et al.* - Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 0027-8424. 98:19 (2001) 10869–74.
12. FAN, Cheng *et al.* - Concordance among Gene-Expression–Based Predictors for Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**. ISSN 0028-4793. 355:6 (2006) 560–569.

13. TESCHENDORFF, Andrew E. *et al.* - An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. **Genome Biology**. ISSN 14747596. 8:8 (2007).
14. **Cancro da Mama- Fatores de risco** - [Consult. 15 fev. 2019]. Disponível em <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-fatores-de-risco/>
15. FREIRE, Carlos; OLIVEIRA, De; SIMÕES, Teresa - 37 Carcinoma invasivo da mama : do diagnóstico ao tratamento cirúrgico. 2008).
16. YOUK, Ji Hyun; KIM, Eun Kyung - Supplementary screening sonography in mammographically dense breast: Pros and Cons. **Korean Journal of Radiology**. ISSN 12296929. 11:6 (2010) 588–593.
17. BERG, Wendie A. *et al.* - Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. **Radiology**. ISSN 1043321X. 233:3 (2004) 830–849.
18. **Cancro da Mama - Métodos de Tratamento** - [Consult. 18 abr. 2019]. Disponível em <https://www.ligacontracancro.pt/cancro-da-mama-metodos-de-tratamento/>
19. LITIÈRE, Saskia *et al.* - Breast conserving therapy versus mastectomy for stage I-II breast cancer: 20 year follow-up of the EORTC 10801 phase 3 randomised trial. **The Lancet Oncology**. ISSN 14702045. 13:4 (2012) 412–419.
20. VERONESI, Umberto *et al.* - Twenty-year follow-up of a randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **The New England journal of medicine**. ISSN 1533-4406. 347:16 (2002) 1227–1232.
21. HARTMANN-JOHNSEN, Olaf Johan *et al.* - Survival is Better After Breast Conserving Therapy than Mastectomy for Early Stage Breast Cancer: A Registry-Based Follow-up Study of Norwegian Women Primary Operated Between 1998 and 2008. **Annals of Surgical Oncology**. ISSN 15344681. 22:12 (2015) 3836–3845.
22. ALPHONSE TAGHIAN, MD, PhD; MOATAZ N EL-GHAMRY, MD; SOFIA D MERAJVER, MD, PhD - **Overview of the treatment of newly diagnosed, non-metastatic breast cancer**, atual. 2019. [Consult. 15 mar. 2019]. Disponível em [https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-newly-diagnosed-non-metastatic-breast-cancer?search=Overview of the treatment of newly diagnosed, non-metastatic breast cancer&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&displ](https://www.uptodate.com/contents/overview-of-the-treatment-of-newly-diagnosed-non-metastatic-breast-cancer?search=Overview%20of%20the%20treatment%20of%20newly%20diagnosed%20non-metastatic%20breast%20cancer&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&displ)

23. HAAGENSEN CD, Stout AP. - Carcinoma of the Breast. II-Criteria of Operability. **Annals of Surgery**. 118:6 (1943) 1032–1051.
24. SINHA, R. - Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. **Molecular Cancer Therapeutics**. ISSN 1535-7163. 5:8 (2006) 1909–1917.
25. TRAN, Stephanie *et al.* - Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**. ISSN 2001-1326. 6:1 (2017). doi: 10.1186/s40169-017-0175-0.
26. VINCENZO, Amendola *et al.* - Surface plasmon resonance in gold nanoparticles: a review. **Journal of Physics: Condensed Matter**. 29:20 (2017) 203002.
27. AJNAI, Giimel *et al.* - Trends of Gold Nanoparticle-based Drug Delivery System in Cancer Therapy. **Journal of Experimental and Clinical Medicine**. ISSN 18783325. 6:6 (2014) 172–178.
28. TURKEVICH, John *et al.* - Discussion of the Faraday Society on Size and Shape of Colloidal Particles. **Anal. Chem.** 1:4 (1949) 18.
29. SCHULZ, Florian *et al.* - Little adjustments significantly improve the Turkevich synthesis of gold nanoparticles. **Langmuir**. ISSN 15205827. 30:35 (2014) 10779–10784.
30. POLTE, Jörg *et al.* - Mechanism of Gold Nanoparticle Formation in the Classical Citrate Synthesis Method Derived from Coupled In Situ XANES and SAXS Evaluation. 132:4 (2010) 1296–1301.
31. POLTE, Jörg *et al.* - SAXS in combination with a free liquid jet for improved time-resolved in situ studies of the nucleation and growth of nanoparticles. **Chemical Communications**. ISSN 13597345. 46:48 (2010) 9209–9211.
32. POLTE, Jörg - Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles - a new perspective. **CrystEngComm**. ISSN 14668033. 17:36 (2015) 6809–6830.
33. Ji, Xiaohui *et al.* - Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction : The Third Role of Citrate. **J. Am. Chem. Soc.** 129:45 (2007) 13939–13948.
34. OJEA-JIMÉNEZ, Isaac; BASTÚS, Neus; PUNTES, Victor - Influence of the sequence of the reagents addition in the citrate-mediated synthesis of gold nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**. ISSN 19327455. 115:32 (2011) 15752–15757.
35. MALIK, Parth; MUKHERJEE, Tapan K. - Recent advances in gold and silver nanoparticle based therapies for lung and breast cancers. **International Journal of Pharmaceutics**.



ISSN 18733476. 553:1–2 (2018) 483–509. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.10.048.

36. BRUST, Mathias *et al.* - Synthesis of Thiol-derivatised Gold Nanoparticles in a Two-phase Liquid-Liquid System. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**. 7 (1994) 801–802. doi: 10.1039/C39940000801.
37. PERALA, Siva Rama Krishna; KUMAR, Sanjeev - On the mechanism of metal nanoparticle synthesis in the Brust-Schiffrin method. **Langmuir**. ISSN 07437463. 29:31 (2013) 9863–9873.
38. SZTANDERA, Krzysztof; GORZKIEWICZ, Michał; KLAJNERT-MACULEWICZ, Barbara - Gold Nanoparticles in Cancer Treatment. **Molecular Pharmaceutics**. ISSN 15438392. 16:1 (2019) 1–23.
39. NORUZI, Masumeh *et al.* - Rapid green synthesis of gold nanoparticles using Rosa hybrida petal extract at room temperature. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. ISSN 13861425. 79:5 (2011) 1461–1465.
40. HERIZCHI, Roya *et al.* - Current methods for synthesis of gold nanoparticles. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**. ISSN 2169141X. 44:2 (2016) 596–602.
41. SINGH, Priyanka *et al.* - Gold nanoparticles in diagnostics and therapeutics for human cancer. **International Journal of Molecular Sciences**. ISSN 14220067. 19:7 (2018).
42. TIWARI, Pooja *et al.* - Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications. **Nanomaterials**. 1:1 (2011) 31–63.
43. ZHANG, Guodong *et al.* - Influence of anchoring ligands and particle size on the colloidal stability and in vivo biodistribution of polyethylene glycol-coated gold nanoparticles in tumor-xenografted mice. **Biomaterials**. ISSN 15378276. 30:10 (2009) 1928–1936.
44. SYKES, Edward A. *et al.* - Investigating the impact of nanoparticle size on active and passive tumor targeting efficiency. **ACS Nano**. ISSN 1936086X. 8:6 (2014) 5696–5706.
45. BERTRAND, Nicolas *et al.* - Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. **Advanced Drug Delivery Reviews**. ISSN 0169409X. 66:2014) 2–25.
46. WANG, Shouju; GUANGMING, Lu - Applications of Gold Nanoparticles in Cancer Imaging and Treatment. Em **Intechv**. i. p. 13.
47. HAINFELD, James F. *et al.* - Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. **British Journal of Radiology**. ISSN 00071285. 84:1002 (2011) 526–533.

48. RILEY, Rachel S.; DAY, Emily S. - Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**. ISSN 19395116. 9:4 (2017) e1449.
49. HUANG, Xiaohua *et al.* - Cancer cell imaging and photothermal therapy in the near-infrared region by using gold nanorods. **Journal of the American Chemical Society**. ISSN 00027863. 128:6 (2006) 2115–2120.
50. PERRAULT, Steven D. *et al.* - Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. **Nano Letters**. ISSN 15306984. 9:5 (2009) 1909–1915.
51. PÉREZ-HERNÁNDEZ, Marta *et al.* - Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. **ACS Nano**. ISSN 1936086X. 9:1 (2015) 52–61.
52. HIRSCH, L. R. *et al.* - Nanoshell-mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. ISSN 0027-8424. 100:23 (2003) 13549–13554.
53. LOWERY, Amanda R. *et al.* - Immunonanoshells for targeted photothermal ablation of tumor cells. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 11769114. 1:2 (2006) 149–154.
54. LEE, Jihyun *et al.* - Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. **Cancer Lett.** 347:1 (2014) 46–53.
55. HAINFELD, James F.; SLATKIN, Daniel N.; SMILOWITZ, Henry M. - The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. **Physics in Medicine and Biology**. ISSN 00319155. 49:18 (2004).
56. JAIN, Suneil *et al.* - Cell-Specific Radiosensitization by gold nanoparticles at megavoltage radiation energies. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. ISSN 03603016. 79:2 (2011) 531–539.
57. RAEESI, Vahid; CHAN, Warren C. W. - Improving nanoparticle diffusion through tumor collagen matrix by photo-thermal gold nanorods. **Nanoscale**. ISSN 20403372. 8:25 (2016) 12524–12530.
58. YOU, Jian *et al.* - Photothermal-chemotherapy with doxorubicin-loaded hollow gold nanospheres: A platform for near-infrared light-triggered drug release. **Journal of Controlled Release**. ISSN 01683659. 158:2 (2012) 319–328.

59. DOU, Shuang *et al.* - Doxorubicin-tethered responsive gold nanoparticles facilitate intracellular drug delivery for overcoming multidrug resistance in cancer cells. **ACS Nano**. ISSN 1936-086X. 5:5 (2011) 3679–3692.
60. RAJABI, Mehdi; MOUSA, Shaker - The Role of Angiogenesis in Cancer Treatment. **Biomedicines**. 5:2 (2017) 34.
61. BALAKRISHNAN, S. *et al.* - Gold nanoparticle–conjugated quercetin inhibits epithelial–mesenchymal transition, angiogenesis and invasiveness via EGFR/VEGFR-2-mediated pathway in breast cancer. **Cell Proliferation**. ISSN 13652184. 49:6 (2016) 678–697.
62. JIA, Yan Peng *et al.* - The in vitro and in vivo toxicity of gold nanoparticles. **Chinese Chemical Letters**. ISSN 10018417. 28:4 (2017) 691–702.
63. JONG, Wim DE *et al.* - Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. **Biomaterials**. ISSN 01429612. 29:12 (2008) 1912–1919.
64. LIU *et al.* - Size-dependent in vivo toxicity of PEG-coated gold nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. ISSN 11782013. 6:2011) 2071–2081.
65. WANG, Yucai *et al.* - Comparison Study of Gold for Photothermal Cancer Treatment. **ACS Nano**. 7:3 (2013) 2068–2077.
66. WANG, Shuguang *et al.* - Challenge in Understanding Size and Shape Dependent Toxicity of Gold Nanomaterials in Human Skin Keratinocytes. **Chem Phys Lett**. ISSN 19326203. 463:1–3 (2008) 145–149.
67. NIIDOME, Takuro *et al.* - PEG-modified gold nanorods with a stealth character for in vivo applications. **Journal of Controlled Release**. ISSN 01683659. 114:3 (2006) 343–347.
68. LASAGNA-REEVES, C. *et al.* - Bioaccumulation and toxicity of gold nanoparticles after repeated administration in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. ISSN 0006291X. 393:4 (2010) 649–655.
69. LEEA, Jihyoun *et al.* - Gold nanoparticles in breast cancer treatment: Promise and potential pitfalls. **Cancer Lett**. 347:1 (2014) 46–53.

## 7. Anexos

**Anexo I** - Sistema de estadiamento para o cancro da mama, baseado no sistema proposto pelo *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*.

<b>Quadro 4. American Joint Committee on Cancer TNM sistema de estadiamento para o cancro da mama</b>	
<b>Tumor primário</b>	
TX	O tumor primário não pode ser encontrado
T0	Não se evidencia o tumor primário
Tis	Carcinoma intraductal, carcinoma lobular <i>in situ</i> , doença de Paget do mamilo sem tumor invasivo no tecido mamário normal
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Tis (CLIS)	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
Tis(Paget)	Doença de Paget do mamilo sem tumor (Nota: a doença de Paget do mamilo associada a um tumor é classificada conforme o tamanho do tumor)
T1	Tumor não ultrapassa os 2,0 cm, na sua maior dimensão
T1mi	Microinvasão não superior a 0,1 cm na maior dimensão
T1a	Tumor maior do que 0,1 cm, mas não superior a 0,5 cm, na maior dimensão
T1b	Tumor maior do que 0,5 cm, mas não superior a 1,0 cm, na maior dimensão
T1c	Tumor maior do que 1,0 cm, mas não superior a 2,0 cm, na sua maior dimensão
T2	Tumor maior do que 2,0 cm, mas menor do que 5,0 cm, na sua maior dimensão
T3	Tumor maior do que 5 cm na sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão directa à parede* torácica ou à pele†, apenas de acordo com a descrição seguinte:
T4a	Extensão à parede torácica, não incluindo apenas a aderência/invasão do músculo peitoral
T4b	Edema (incluindo «pele de laranja»), ou ulceração da pele da mama, ou nódulos satélites da pele confinados à mesma mama, sem características de carcinoma inflamatório
T4c	Ambos T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório
<b>Gânglios regionais</b>	
NX	Os gânglios regionais não podem ser avaliados (p. ex. foram previamente removidos)
N0	Ausência de metástases nos gânglios regionais
N1	Metástase em gânglio (s) axilar ipsilateral móvel, nos níveis I e II
N2	Metástase em gânglio (s) axilar ipsilateral, níveis I e II, fixo ou aderente, ou gânglio (s) da mama interna ipsilateral clinicamente evidenciado*, na ausência de evidência clínica de metástases ganglionares
N2a	Metástases em gânglios axilares ipsilaterais, níveis I e II, fixos (aderentes) entre si ou a outras estruturas
N2b	Metástases apenas clinicamente evidentes* em gânglios da mama interna ipsilateral e na ausência de metástases clinicamente evidentes nos gânglios axilares níveis I e II

<b>Gânglios regionais</b>	
N3	Metástase no gânglio (s) infraclavicular ipsilateral (axilar nível III) com ou sem envolvimento ganglionar axilar dos níveis I e II; ou evidência* clínica de gânglio (s) da mama interna ipsilateral na presença de metástases ganglionares axilares ipsilaterais, níveis I e II, clinicamente evidentes; ou metástases em gânglio (s) supraclavicular ipsilateral com ou sem envolvimento metastático de gânglio (s) axilar ou da mama interna ipsilateral
N3a	Metástase em gânglio (s) infraclavicular ipsilateral
N3b	Metástase em gânglio (s) da mama interna ipsilateral e em gânglio (s) axilar ipsilateral
N3c	Metástase em gânglio (s) supraclavicular ipsilateral
<b>Classificação patológica (pN)<sup>†</sup></b>	
pNX	Os gânglios regionais não podem ser avaliados (p. ex. não foram removidos ou foram removidos previamente)
pN0	Ausência de metástases nos gânglios regionais no estudo histopatológico. ITCs são definidos como grupo de células igual ou inferior a 0,2 mm, ou simples células tumorais, ou um grupo com menos de 200 células num único corte. ITCs podem ser detectadas por histologia convencional ou IHQ. Os gânglios contendo apenas ITCs são excluídos do número total de gânglios positivos, mas são incluídos no número total de gânglios avaliados.
pN0(i-)	Ausência de metástases no estudo histopatológico dos gânglios regionais e IHQ negativa
pN0(i+)	Células malignas nos gânglios regionais com uma dimensão igual ou inferior a 0,2 mm (detectadas por H&E ou IHQ, incluindo ITC)
pN0(mol-)	Ausência de metástases no estudo histopatológico dos gânglios regionais e estudo molecular (RT-PCR) negativo
pN0(mol+)	Ausência de metástases no estudo histopatológico dos gânglios regionais e estudo molecular (RT-PCR) positivo
pN1	Micrometástases ou metástases em 1-3 gânglios axilares, e/ou em gânglios da mama interna, com doença microscópica detectada na biopsia do SLN, mas não clinicamente aparente
pN1mi	Micrometástases (>0,2 mm e/ou >200 células, mas não >2,0 mm)
pN1a	Metástases em 1-3 gânglios axilares, sendo pelo menos uma metástase >2 mm
pN1b	Metástases nos gânglios da mama interna com micrometástases ou macrometástases detectadas na biopsia do SLN, mas não clinicamente aparente <sup>†</sup>
pN1c	Metástases em 1-3 gânglios axilares e em gânglios da mama interna com micrometástases ou macrometástases detectadas na biopsia do SLN, mas não clinicamente aparente <sup>†</sup> .

<b>Classificação patológica (pN)<sup>†</sup></b>		
pN2		Metástases em 4-9 gânglios axilares, ou em gânglios da mama interna clinicamente aparentes <sup>‡</sup> na ausência de metástases nos gânglios axilares
	pN2a	Metástases em 4-9 gânglios axilares (pelo menos uma metástase deve ser superior a 2,0 mm)
	pN2b	Metástases clinicamente aparentes <sup>‡</sup> em gânglios da mama interna na ausência de metástases nos gânglios axilares
pN3		Metástases em 10 ou mais gânglios axilares, ou em gânglios infraclaviculares (axilar nível III), ou em gânglio (s) clinicamente aparente <sup>‡</sup> da mama interna ipsilateral na presença de um ou mais gânglios axilares positivos níveis I e II, ou em mais do que três gânglios axilares com micrometástases ou metástases detectadas na biopsia do SLN mas não clinicamente detectadas, ou em gânglios supraclaviculares ipsilaterais
	pN3a	Metástases em 10 ou mais gânglios axilares (pelo menos uma metástase > 2,0 mm); ou metástases em gânglios infraclaviculares (axilar nível III)
	pN3b	Metástases clinicamente aparentes <sup>§</sup> em gânglios da mama interna ipsilateral na presença de um ou mais gânglios axilares positivos; ou, em mais do que três gânglios axilares e gânglios na mama interna com micrometástases ou macrometástases detectadas pela biopsia do SLN, mas não clinicamente aparente <sup>‡</sup>
	pN3c	Metástases em gânglios supraclaviculares ipsilaterais
<b>Metástases à distância</b>		
M0		Ausência de metástases à distância
cM0(+)		Sem metástases clínica ou radiologicamente detectadas, mas depósitos moleculares ou células tumorais detectadas por microscopia no sangue circulante, medula óssea, ou outros tecidos não regionais, com dimensões iguais ou inferiores a 0,2 mm ou doentes sem sintomas ou sinais de metástases
M1		Metástases à distância
<b>Grupos de estadiamento da AJCC</b>		
<i>Estádio 0</i>		Tis, N0, M0
<i>Estádio I</i>	<i>Estádio IA</i>	T1**, N0, M0
	<i>Estádio IB</i>	T0, N1mi, M0
<i>Estádio II</i>		T1**, N1mi, M0
	<i>Estádio IIA</i>	T0, N1, M0
		T1**, N1, M0
	<i>Estádio IIB</i>	T2, N0, M0
T2, N1, M0		
<i>Estádio III</i>	<i>Estádio IIIA</i>	T3, N0, M0
		T0, N2, M0
		T1**, N2, M0
		T2, N2, M0
		T3, N1, M0
		T3, N2, M0

#### Grupos de estadiamento da AJCC

<i>Estádio IIIB</i>	T4, N0, M0 T4, N1, M0 T4, N2, M0
<i>Estádio IIIC<sup>†</sup></i>	Qualquer T, N3, M0
<i>Estádio IV</i>	Qualquer T, qualquer N, M1

\* Clinicamente aparente é definido como detectado por estudos de imagem (exclui-se a linfocintigrafia) ou pelo exame clínico ou por exame macroscópico patológico.

<sup>†</sup> Classificação baseada no esvaziamento ganglionar axilar com ou sem biopsia do SLN. Classificação baseada somente na biopsia do SLN sem subsequente esvaziamento axilar é designada (sn) para o SLN, p. ex. pN0(I+)(sn).

<sup>‡</sup> RT-PCR: reacção em cadeia da transcriptase-polimerase reversa.

<sup>§</sup> Clinicamente aparente é definida como detectada por estudos de imagem (exclui-se a linfocintigrafia) ou pelo exame clínico.

<sup>¶</sup> Não clinicamente aparente é definido como não detectado por estudos de imagem (exclui-se a linfocintigrafia) ou pelo exame clínico.

\*\* T1 inclui T1 mic.

**Fonte:** FREIRE, Carlos; OLIVEIRA, De; SIMÕES, Teresa - 37 Carcinoma invasivo da mama : do diagnóstico ao tratamento cirúrgico. 2008).

## Anexo 2- Síntese biológica de nanopartículas de ouro e suas aplicações.

Microorganism	Spectious Name	Size range (nm)	Shape of AuNPs	Application
Plant-based compounds and derivatives	<i>Panax ginseng</i>	10-40	Spherical	Antibacterial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria Antifungal activity against <i>Puccinia graminis tritici</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus niger</i> and <i>Candida albicans</i> Selective toxicity towards U87 glioblastoma multiforme cell line under normal and hyperglycemic condition High potential for use in the treatment of anticancer, antidiabetic Excellent catalytic activity Good catalytic activity for the reduction of 4-nitrophenol to 4-aminophenol by excess NaBH <sub>4</sub> High potential for use in biological applications Antibacterial activity of the green synthesized Au NPs against bacterial strains of <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> Antifungal activity May promote anti-hyperglycemic antioxidant activity Enhance the mitotic cell division and pollen germination activity Antibacterial activity against clinically isolated pathogens Antibacterial activity against <i>Escherichia coli</i> Medical and pharmaceutical applications Potential application of this microorganism in bioremediation of gold-bearing waste
	<i>Cucumen playtcladi</i>	20-50	Spherical, triangular/hexagonal	
	<i>Plumbago zeylanica</i>	> 100	Spherical, triangles, hexagons	
	<i>Abelmoschus esculentus</i>	45-75	Spherical	
	<i>Hibiscus sabdariffa</i>	25-30	Spherical	
	<i>Cucurbita pepo L. leaves</i>	10-15	Spherical	
	<i>Morinda citrifolia</i>	12.17-38.26	Spherical	
	<i>Eucommia ulmoides</i>	~20	Spherical	
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	15-20	Spherical	
	<i>Zingiber officinale</i>	10	Spherical	
	<i>Hibiscus rosa sinensis</i>	~14	Spherical, triangular	
	<i>Rosa hybrida</i>	10	Cubic	
	<i>Euphorbia hirta L.</i>	6-71	Spherical	
Bacteria	<i>Abelmoschus esculentus</i>	62	Spherical	
	<i>Cassia auriculata</i>	15-25	Spherical, hexagonal, triangular	
	<i>Couroupita guianensis, Aubl.</i>	26 ± 11	Cubic	
	<i>Terminalia arjuna.</i>	20-50	Spherical	
	<i>Mentha piperita</i>	> 100	Spherical	
	<i>Klebsiella pneumoniae (MTCC-4030)</i>	10-15	Spherical	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35-65	Spherical	
	<i>Geobacillus sp. strain ID17</i>	5-50	Quasi-hexagonal	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	35-65	Spherical	
	<i>Escherichia coli K12</i>	50	Spherical	
	<i>Acinetobacter sp. SW 30</i>	20 ± 10	Triangle, rod, spherical	
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5-30	Spherical, triangular	
	<i>Bacillus Subtilis</i>	10-15	Cubic	
<i>Aspergillus sydowii</i>	8.7-15.6	Spherical		
<i>Rhizopus oryzae</i>	43 ± 19	Flower-like		
<i>Penicillium citrinum</i>	60-80	Spherical		
<i>Alternaria sp.</i>	7-13 and 15-18 and 69-93	Quasi-spherical, Spherical, square, rod, pentagonal, hexagonal		
<i>Neurospora crassa</i>	32	Spherical		
<i>Spirulina platensis</i>	~5	Spherical		
<i>Turbinaria conoides and Sargassum tenninum</i>	27-35	Spherical		
<i>Sargassum swartzii</i>	35	Spherical		
<i>Stoechospermum marginatum</i>	18.7-93.7	Hexagonal, triangle		
<i>Cytosostira baccata (CB)</i>	8.4 ± 2.2	Spherical		
<i>Tetraselmis kochensis</i>	5-35	Spherical		
<i>Kappaphycus alvarezii</i>	10-40	Spherical		
<i>Instant high-sugar dry yeasts</i>	Dependent on PH	Triangle, truncated triangle, hexagon Nano plates		
<i>Yeast extract manniol (YEM)</i>	4-20	Spherical		
<i>Baker's yeast (Saccharomyces cerevisiae)</i>	~5.0 ± 2.0	Spherical		
<i>Hansenula polymorpha</i>	20-40	Spherical		
<i>tabacco mosaic virus (TMV)</i>	10-40	Spherical		
Viruses				Anticancer evaluation against Ehrlich ascites carcinoma cells

Fonte: ELAHI, Narges; KAMALI, Mehdi; BAGHERSAD, Mohammad Hadi - Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*. ISSN 0039-9140. 184:2018) 537-556.



**Anexo 3-** Grupos funcionais usados para a funcionalização de nanopartículas de ouro e suas respectivas aplicações.

S. No.	Functional Group	Ligands/Carrier Molecule	Key Feature	Application	Reference
1	Polyethylene Glycol (PEG)	PEG with ligands such as a dye attached through thiol group	Adherence to the cell membrane	Cellular and intracellular targeting, biodistribution studies	[21–25]
2	Amine Group	PEG	siRNA carrier	Useful in RNAi technology	[26]
3	Carboxyl Group	Proteins	-	Various depending on the protein	[27]
4	Peptide	Cell surface receptors, amyloid inhibitory peptide + sweet arrow peptide, antibody, octrotride peptide	Cytoplasmic and nuclear translocation, adjuvant, targeting carcinoma cells analogue of somatostatin	Cellular and intracellular targeting, macrophage and pro-inflammatory cytokine elicitation, bioimaging, imaging of cancer cells	[28–32]
5	DNA	Aptamer, PEGylated gold-poly ( $\beta$ -amino ester), Thiolated ssDNA of RNA I gene, antisense DNA oligonucleotides	Targeting Prostate cancer cells, siRNA carrier, binds to antisense RNA of p53	Bioimaging, gene delivery, RNAi-regulation of transgene expression, detection of specific genes e.g., for microbial detection	[33–37]
6	RNA	Polyvalent RNA-gold nanoconjugates	-	RNAi	[38]
7	Antibodies	scFv Antibodies against various pathogens	Smaller size, label fidelity	Immunoassays, treatment and diagnosis e.g., antibodies against aflatoxins	[39–41]

**Fonte:** HAINFELD, James F. *et al.* - Micro-CT enables microlocalisation and quantification of Her2-targeted gold nanoparticles within tumour regions. **British Journal of Radiology**. ISSN 00071285. 84:1002 (2011) 526–533.