



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Carina Alexandra Teixeira Monteiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Unraveling the potential of nanotechnology towards cutaneous melanoma therapy – an update review” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Dina Lopes, do Dr. Manuel Felisberto e da Professora Doutora Ana Cláudia Santos 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

Carina Alexandra Teixeira Monteiro

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Unraveling the potential of nanotechnology towards cutaneous melanoma therapy – an update review“ referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação da Dra. Dina Lopes, do Dr. Manuel Felisberto e da Professora Doutora Ana Cláudia Santos, 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

Eu, Carina Alexandra Teixeira Monteiro, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2014212937, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Unraveling the potential of nanotechnology towards cutaneous melanoma therapy – an update review” 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, 2 de setembro de 2019.

Carina Alexandra Teixeira Monteiro

Carina Alexandra Teixeira Monteiro

*“Se queres ser um grande profissional amanhã,
começa por ser um grande aprendiz hoje.”*

Inácio Dantas

AGRADECIMENTOS

Chegando ao final de uma das etapas mais importantes da minha vida, não poderia deixar de prestar os meus sinceros agradecimentos a quem fez parte desta jornada e contribuiu para todo o caminho por mim percorrido. Pelo contributo de várias pessoas sem as quais esta concretização não teria sido possível, tenho de agradecer:

Aos meus pais, por todo o apoio incondicional, a quem deixo o meu maior agradecimento. Por estarem sempre presentes e por me terem dado todas as bases para ser a pessoa com princípios e valores da qual me orgulho. Acima de tudo, pelo vosso sacrifício, o meu maior obrigada! Amo-vos!

Ao meu namorado, pela paciência e companheirismo, e pelo constante carinho e conforto. Obrigada por teres estado sempre presente.

Aos meus amigos e a todos que, de 2014 a 2019, se cruzaram comigo, e fizeram estes 5 anos serem tão gratificantes, especiais e recompensadores.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e corpo docente, em particular à Professora Doutora Ana Cláudia Santos, por me terem acolhido e inculcido toda a exigência e sentido de responsabilidade.

Ao INFARMED, I.P., em particular à DAM, pela oportunidade de aprendizagem que me proporcionaram.

A toda a equipa da Farmácia Avenida, em particular ao Dr. Manuel Felisberto, que tive o privilégio de ter como orientador. Pelo conhecimento, entusiasmo e competência que este profissional me transmitiu, e pela total confiança que depositou em mim desde o primeiro dia. Não é possível quantificar o quanto aprendi com toda esta equipa fantástica.

A todos vós, e a Coimbra...
OBRIGADA.

ÍNDICE

Parte I - Relatório de Estágio no Infarmed, I.P.

Lista de Abreviaturas.....	8
1 Nota Introdutória	9
2 Enquadramento - O INFARMED, I.P.....	9
2.1. Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM)	10
2.1.1. Unidade de Manutenção no Mercado (UMM)	10
3 Funções desempenhadas.....	12
3.1. Caso Prático – pedido de alteração tipo II	12
4 Análise SWOT.....	13
4.1. Pontos Fortes.....	13
4.2. Pontos Fracos.....	15
4.3. Oportunidades	16
4.4. Ameaças.....	18
5 Considerações Finais	19
6 Bibliografia.....	20
7 Anexos	22

Parte II - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	28
1 Nota Introdutória	29
2 Enquadramento – Farmácia Avenida	30
3 Funções desempenhadas.....	30
3.1. Caso Prático	31
4 Análise SWOT	31
4.1. Pontos Fortes.....	32
4.2. Pontos Fracos.....	36
4.3. Oportunidades	37
4.4. Ameaças.....	38
5 Considerações Finais	39
6 Bibliografia.....	40
7 Anexos	42

Parte III - Monografia intitulada "Unraveling the potential of nanotechnology towards cutaneous melanoma therapy – an update review"

Abstract.....	48
Resumo.....	49

List of abbreviations	50
Figure index.....	53
Table index.....	54
1 Introduction	55
2 Cutaneous melanoma	58
2.1. Physiopathology.....	58
2.2. Risk factors.....	59
2.3. Oncogenic pathways and biomarkers	61
2.4. Diagnosis	63
2.5. Therapy.....	64
2.5.1. Surgery.....	65
2.5.2. Radiotherapy.....	65
2.5.3. Chemotherapy.....	65
2.5.4. Immunotherapy	66
2.5.5. Targeted therapy	67
3 Application of nanosystems in cutaneous melanoma therapy.....	69
3.1. Topical administration.....	71
3.1.1. Nanoemulsions	71
3.1.2. Liposomes.....	72
3.1.3. Carbon-based nanosystems.....	73
3.2. Intraperitoneal.....	73
3.2.1. Albumin nanoparticles	73
3.3. Intravenous administration.....	74
3.3.1. Solid lipid nanoparticles	74
3.3.2. Nanostructured lipid carriers.....	75
3.3.3. Polymeric micelles	76
3.3.4. Gold nanoparticles	77
3.4. Intradermal administration	78
3.4.1. Nanoemulsions	78
3.5. Intratumoral administration	80
3.5.1. Copper nanoparticles	80
3.6. Oral administration	81
3.6.1. Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles.....	81
4 Concluding remarks and future perspectives.....	82
5 References.....	84
6 Annexs	93

PARTE I

RELATÓRIO DE ESTÁGIO NO INFARMED, I.P.



Carina Alexandra Teixeira Monteiro

Orientadora: Dra. Dina Lopes

Lista de Abreviaturas

AC - Autoridade Competente

AIM - Autorização de Introdução no Mercado

ARM - Assuntos Regulamentares do Medicamento

CAM - Comissão de Avaliação de Medicamentos

CEE - Comunidade Económica Europeia

CHPL - Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa

CMDh - Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures – Human

CTD - Common Technical Document

DAM - Direção de Avaliação de Medicamentos

DIL - Direção de Inspeção e Licenciamentos

DMF - Drug Master File

EEE - Espaço Económico Europeu

EMR - Estado Membro de Referência

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FI - Folheto Informativo

GiMED - Gestão de Informação de Medicamentos

INFARMED, I.P. - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

IPST, IP - Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

RCM - Resumo das Características do Medicamento

SMUH - ALTER - Plataforma de Submissão de Pedidos de Alteração do Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano

SWOT - Strengths (Forças), Weaknesses (Fraquezas), Opportunities (Oportunidades) e Threats (Ameaças)

UAC - Unidade de Avaliação Científica

UE - União Europeia

UEC - Unidade de Ensaio Clínicos

UIM - Unidade de Introdução no Mercado

UMM - Unidade de Manutenção no Mercado

I | Nota Introdutória

Os cinco anos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) culminam com a realização do estágio curricular, que é uma mais-valia para a formação de profissionais técnico-cientificamente competentes. O plano de estudos do MICF compreende a unidade curricular “Assuntos Regulamentares do Medicamento” que, pessoalmente, me despertou o interesse por esta vertente farmacêutica, dada a importância do ciclo de vida do medicamento. O facto de a FFUC nos possibilitar a realização do estágio curricular em entidades regulamentares é, sem dúvida, uma ótima oportunidade, tendo em conta que o setor farmacêutico se encontra em evolução e que houve uma grande expansão na área da Indústria Farmacêutica nos últimos anos.

A abrangência do conteúdo do ato farmacêutico está prevista nos artigos 77º e 78º do Decreto-Lei 288/2001 de 10 de novembro, que demonstra a sua aplicabilidade em diversos setores para além da tradicional Farmácia Comunitária [1]. Ao longo da minha formação académica sempre privilegiei a realização de estágios extracurriculares, tendo realizado estágios de verão em Análises Clínicas e em Farmácia Comunitária. Neste ponto, senti a necessidade de completar a minha formação com um estágio no INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P., na área de Assuntos Regulamentares do Medicamento. Sendo assim, durante três meses integrei a UMM (Unidade de Manutenção no Mercado) da DAM (Direção de Avaliação de Medicamentos).

O presente relatório compreende uma apreciação crítica desta experiência profissional, iniciando-se com o enquadramento do INFARMED, I. P., seguida de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats*) onde pretendo explicitar os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que marcaram este estágio. Acrescento que ficará salvaguardado qualquer assunto alvo de confidencialidade ou sigilo profissional.

2 | Enquadramento - O INFARMED, I.P.

Portugal sofreu uma adaptação gradual às variadas diretivas europeias aquando da sua adesão, em 1986, à antiga Comunidade Económica Europeia (CEE). I contribuiu para a necessidade da criação de um organismo que fosse credível no controlo de todo o ciclo de vida do medicamento. Surgiu conseqüentemente, em 1993, o Infarmed, que à data da sua criação era das poucas autoridades europeias que integrava todas as valências relativas ao medicamento [2]. O Infarmed, com sede atual em Lisboa, “*é um instituto público de regime especial, nos termos da lei, integrado na administração indireta do Estado, dotado de autonomia administrativa, financeira e património próprio, com jurisdição sobre todo o território nacional, sem*

prejuízo da colaboração dos órgãos próprios das Regiões Autónomas, de acordo com as suas atribuições” [3]. Tem por missão supervisionar e regular os medicamentos de uso humano e produtos de saúde (cosméticos e dispositivos médicos), garantindo o acesso a estes por parte dos cidadãos e profissionais de saúde, com a máxima qualidade, segurança e eficácia, e com elevados padrões de proteção da saúde pública [4]. Esta autoridade nacional encontra-se dividida em 5 órgãos (o Conselho Diretivo e respetivos 4 órgãos consultivos) e 12 unidades orgânicas (que se dividem consoante a sua função seja de suporte à autoridade ou de negócio), conforme no Organograma do Anexo I [5].

2.1. Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM)

O meu estágio foi realizado na DAM, direção dirigida pela Dra. Marta Marcelino, cujas funções estão detalhadamente enunciadas no artigo 3.º do anexo da Portaria n.º 306/2015 de 23 de setembro referente aos *Estatutos do INFARMED - Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.*. O documento supracitado encontra-se disponível para consulta no Anexo II [6].

A DAM é constituída por 4 unidades orgânicas. Três delas são especializadas na área de intervenção, nomeadamente a Unidade de Introdução no Mercado (UIM), a Unidade de Manutenção do Mercado (UMM) a Unidade de Ensaios Clínicos (UEC), e a restante, Unidade de Avaliação Científica (UAC), tem carácter transversal. O artigo 4.º presente na deliberação n.º 1991/2015 do *Regulamento Interno da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.* compreende as respetivas funções de cada Unidade, consoante a área de especialização em que cada uma atua. O artigo supracitado encontra-se disponível para consulta no Anexo 3 [7].

O meu estágio decorreu durante três meses na UMM, mais concretamente no departamento da Gestão de Alterações aos Termos da Autorização de Introdução no Mercado (AIM) por Procedimento Nacional.

2.1.1. Unidade de Manutenção no Mercado (UMM)

A comercialização de medicamentos na União Europeia (UE) pressupõe a existência de uma AIM. Contudo, ao longo do tempo, para os medicamentos se manterem atualizados, sofrem alterações pós-AIM que se refletem no *dossier* de AIM, e que, portanto, têm de ser autorizadas pela autoridade competente. Estas alterações seguem procedimentos padronizados, que são regulados, supervisionados e avaliados pela UMM. A UMM é composta por diversas equipas, entre as quais equipas responsáveis por aprovar alterações submetidas por procedimentos nacionais, onde realizei o meu estágio. A esta unidade compete ainda assegurar as atividades que visem a autorização de renovações ou revogações

da AIM de medicamentos. A análise das alterações aos termos da AIM por procedimento nacional segue o Regulamento (CE) n.º 1234/2008 da Comissão, de 24 de novembro de 2008, alterado pelo Regulamento (EU) n.º 712/2012 da Comissão, de 3 de agosto de 2012 [8].

Alterações aos termos da AIM – definição e classificação

Segundo o artigo 3º do capítulo I do anexo II do mesmo documento, uma alteração dos termos de uma AIM é definida como “*alteração dos termos em que uma autorização de introdução no mercado de um medicamento foi concedida, desde que não seja qualificável como extensão, nos termos definidos na legislação da União Europeia*”. De modo geral, as alterações são classificadas como alteração *minor* de tipo IA ou IB ou alteração *major* de tipo II, consoante as repercussões na qualidade, eficácia e segurança do medicamento e consoante o nível de risco para a saúde pública [9].

Documentação importante na análise de alterações aos termos da AIM

Atualmente na UE, os pedidos de AIM, assim como alterações aos termos da AIM, têm de ser submetidos na forma de um *dossier* denominado *CTD* (*Common Technical Document*). Este *dossier* deve incluir todas as informações que comprovem os resultados de ensaios e testes realizados com o medicamento em questão. O *CTD* encontra-se organizado em 5 módulos, conforme é evidenciado no Anexo 4 [10].

A submissão dos pedidos de alterações aos termos da AIM é efetuada pelos requerentes exclusivamente por via eletrónica, através da Plataforma de Submissão de Pedidos de Alteração do Sistema de Gestão de Medicamentos de Uso Humano (plataforma SMUH-ALTER) do Infarmed [11].

O Regulamento (CE) N.º 1234/2008 da Comissão, de 24 de novembro de 2008, relativo à análise das alterações dos termos das AIM especifica os procedimentos a seguir na análise e aprovação de alterações aos termos da AIM. No n.º 1 do artigo 4.º atribui-se à Comissão Europeia a missão de redigir um documento que oriente a interpretação deste Regulamento. Este documento fornece indicações sobre as etapas a seguir numa alteração aos termos da AIM, desde a submissão do pedido por parte do requerente (qual a categoria mais adequada e a documentação a apresentar) até ao resultado final emitido pela AC [12].

Com o objetivo de esclarecer dúvidas relacionadas com os pedidos de alterações aos termos da AIM, o *CMDh* (*Co-ordination Group for Mutual Recognition and Decentralised Procedures - Human*) disponibiliza também *online* alguns documentos, como por exemplo o resumo de perguntas e respostas frequentes (*frequent Questions&Answers*), *templates* úteis, agrupamentos de alterações que são ou não aceitáveis, entre outros [13].

3| Funções desempenhadas

Durante os 3 meses de estágio na DAM-UMM tive a oportunidade de analisar e gerir processos relativos a alterações aos termos da AIM por Procedimento Nacional. As primeiras semanas, mais concretamente a primeira quinzena, foram fulcrais para adquirir a formação base necessária para estar apta a gerir informação na área dos medicamentos de uso humano e poder desempenhar as funções que me foram sendo atribuídas. Desta forma, após as formações iniciais dadas pela orientadora de estágio, Dra. Dina Lopes, e por outros colegas de trabalho da DAM, realizei as seguintes atividades como gestora de processos, que passo a destacar:

- Validação de alterações IA, IB e II - Análise de toda a documentação enviada pelos requerentes (formulário, requerimento, entre outros) e verificação da conformidade do pedido de alteração (agrupamentos, tipificações, entre outros);
- Pedido de elementos de validação - Comunicação com o requerente, por *e-mail* ou contacto telefónico, para solicitação de esclarecimentos e/ou documentação;
- Revisão de alterações feitas ao FI e RCM, com posterior colocação *online* dos mesmos na página eletrónica do INFARMED, I.P;
- Envio de processos (alterações tipo II) à reunião plenária da CAM (Comissão de Avaliação de Medicamentos);
- Envio de documentação à equipa de avaliação técnico-científica (avaliadores) para elaboração/retificação de pareceres (no caso das alterações do tipo IB e II);
- Notificação de decisões finais aos requerentes;
- Participação numa reunião plenária da CAM.

3.1 Caso Prático – pedido de alteração tipo II

Um titular de AIM nacional submeteu à UMM uma alteração B.l.z tipo II, que consistia na atualização do *DMF (Drug Master File)* de uma substância ativa de um determinado fabricante. Após uma análise cuidadosa do processo e de toda a documentação, verifiquei que se cumpriam todos os requisitos regulamentares e procedi à validação do pedido. Assim, introduzi na plataforma SMUH-ALTER o evento “data de validação-validado”, iniciei calendário e agendei o processo para a CAM (através da introdução do evento “Data CAM-aprovação”). Por fim, após aprovação superior do mesmo na CAM, notifiquei o titular da decisão e carreguei os eventos “Data CAD-aprovação”, “Data de notificação ao requerente” e “Data de fecho” na plataforma SMUH-ALTER.

4 | Análise SWOT

O termo *SWOT* é um acrónimo para *strengths*, *weaknesses*, *opportunities* e *threats*. A análise *SWOT*, desenvolvida por Albert Humphrey na Universidade de Stanford na década de 60, é uma ferramenta muito utilizada na análise externa (ameaças e oportunidades) e interna (pontos fortes e fracos) de uma dada organização ou empresa, que permite fazer uma reflexão crítica da envolvente global. É considerada uma ferramenta de gestão útil no planeamento estratégico de um determinado projeto, que permite a implementação de melhorias [14].

Devido à sua simplicidade, pode ser aplicada em qualquer tipo de análise de ambiente, como por exemplo com o intuito de avaliar o meu estágio no Infarmed. Desta forma, apresento de seguida a minha análise *SWOT* sobre o mesmo.

“Concentre-se nos pontos fortes, reconheça as fraquezas, agarre as oportunidades e proteja-se das ameaças” (Sun Tzu, 500 a.C.).

Tabela I. Resumo dos pontos abordados na análise *SWOT*.

Pontos Fortes (Dimensão interna)	Pontos Fracos (Dimensão interna)
<ul style="list-style-type: none">- Contacto com o Inglês técnico- Contacto com a indústria farmacêutica / requerentes / titulares de AIM- Intranet- Localização e Infraestruturas- Receção e integração dos estagiários- Unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento- Equipa da DAM-UMM	<ul style="list-style-type: none">- Duração do estágio- Orientação insuficiente dos estagiários- Dependência dos requerentes para a progressão e finalização dos processos- Falhas nos recursos informáticos- Formação insuficiente na fase pós-AIM dos medicamentos
Oportunidades (Dimensão externa)	Ameaças (Dimensão externa)
<ul style="list-style-type: none">- Participação numa reunião plenária da CAM- Acesso a formações- Perceção de Portugal como EMR (Estado Membro de Referência)- Carreira desafiante para os Farmacêuticos	<ul style="list-style-type: none">- Brexit- Transposição heterogénea de diretivas- Falta de recursos humanos e acumulação de trabalho

4.1 Pontos Fortes

Contacto com o Inglês técnico

Durante o estágio fui confrontada diariamente com documentos redigidos em inglês, bem como com comunicação oral e escrita em inglês. O meu nível e os meus conhecimentos de inglês foram suficientes para desempenhar as tarefas diárias com destreza mas, de facto, o contacto com toda a documentação aprimorou a minha *performance* linguística. A língua inglesa é a língua da comunicação internacional, e os termos técnicos

com os quais fui contactando nunca representaram uma limitação nas funções por mim desempenhadas.

Contacto com a indústria farmacêutica/requerentes/titulares de AIM

Ao longo do estágio houve contacto com a Indústria farmacêutica, tanto por *e-mail* como por telefonemas. Devido à exigência dos titulares de AIM, aprendi a ter uma postura mais formal para saber lidar com as questões colocadas por estes, o que considero ser um ponto forte.

Intranet

O Infarmed possui uma rede interna denominada intranet, disponível apenas para os funcionários internos, que permite uma agilização da comunicação entre as diversas Direções. Nesta rede é ainda possível consultar a ementa semanal do serviço de refeitório.

Localização e Infraestruturas

O Infarmed é composto por quatro pavilhões (edifícios 17-A, 21-A, 24 e 36) situados no Parque de Saúde de Lisboa, cujo mapa detalhado se encontra em anexo (Anexo 5) [15]. Esta é uma zona privilegiada, focada em questões de saúde pública, visto que acolhe outras instituições da área da saúde como por exemplo o Centro Hospitalar Psiquiátrico de Lisboa (CHPL) e o Instituto Português do Sangue e da Transplantação, IP (IPST, IP). Relativamente às infraestruturas, posso adiantar que o Infarmed proporciona as condições necessárias para que os seus colaboradores possam trabalhar confortavelmente e de forma rentável. Existe um serviço de refeitório no Edifício-Sede (pavilhão 21-A) que disponibiliza diariamente, a preços acessíveis, três opções de refeição (carne, peixe ou vegetariano) e nos restantes edifícios existem copas equipadas onde os funcionários podem almoçar, o que é uma mais-valia dada a situação económica atual.

Para a realização do estágio, foi-me dado o substrato necessário para desempenhar as minhas funções, sendo que me foi disponibilizado um espaço próprio que continha uma secretária, cadeira, computador e material de escritório.

Receção e integração dos estagiários

A manhã do primeiro dia de estágio destinou-se à receção dos estagiários. Esta foi feita por um membro da direção dos recursos humanos, José Viana, que explicou de modo geral o funcionamento do Infarmed e entregou um manual de acolhimento com alguma informação sobre a autoridade. Durante a tarde fomos conhecer o nosso posto de trabalho e a orientadora do estágio, Dra. Dina Lopes, apresentou um *template* geral sobre a DAM. O segundo dia foi reservado a uma formação sobre o funcionamento da Direção e respetivas

Unidades e sobre conceitos regulamentares gerais relacionados com a introdução e manutenção de medicamentos no mercado. Considero uma boa receção como um ponto forte, porque na minha opinião é importante que a pessoa se sinta integrada para desempenhar as suas funções com estimulação e sucesso.

Unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento

A unidade curricular de Assuntos Regulamentares do Medicamento (ARM) é uma ferramenta poderosa que a FFUC nos proporciona. Esta unidade curricular foi fulcral para o meu desempenho neste estágio. Nos primeiros dias assisti a breves formações no contexto da introdução e manutenção de medicamentos no mercado (nomeadamente conceitos sobre procedimentos de AIM nacional, categoria e tipificação de alterações, requisitos na submissão de pedidos de alteração) contudo, o facto de já possuir esses conhecimentos permitiu-me fazer uma revisão e consolidação de ideias e ter autonomia nas minhas funções muito mais rapidamente do que se fossem novos conceitos a reter.

Equipa da DAM-UMM

Estagiar na UMM revelou-se uma mais-valia, uma vez que me permitiu aprofundar conhecimentos a nível de procedimentos pós-AIM, visto que a nível académico há maior foco nos procedimentos pré-AIM. A equipa da DAM-UMM auxiliou a minha aprendizagem devido à sua união e competência técnico-científica. Nesta equipa reflete-se o espírito de entreajuda, sendo que quando surgem dúvidas estas são debatidas entre vários colegas a fim de se encontrar a solução mais apropriada, como tive oportunidade de presenciar inúmeras vezes. Durante os três meses de estágio tive a experiência de trabalhar em equipa em contexto profissional, sendo que vários colaboradores me apoiaram, dos quais destaco a Dra. Rute Nogueira, Dra. Ana Teresa Simões e Dr. Carlos Mendes. Abdicando muitas vezes das tarefas acumuladas que tinham a seu cargo, estes profissionais mostraram-se sempre disponíveis em me ajudar, facto que valorizo e considero um ponto forte.

4.2 Pontos Fracos

Duração do estágio

Considero como ponto fraco do estágio a duração do mesmo. Apesar de ter feito a gestão de processos muito heterogéneos, apenas lidei com alterações a nível farmacêutico. Dada a complexidade de alterações que existem, a minha aprendizagem sobre tipificação de alterações poderia ter sido maior caso a duração do estágio fosse maior. Os 3 meses não são suficientes, por exemplo, para passar pela área das alterações clínicas, que é uma área da qual eu gostaria de ter levado algum *feedback*. Na minha opinião, ambos os semestres do 5º

do MICEF poderiam ser reservados exclusivamente à realização dos estágios, ou pelo menos o estágio em ARM deveria ter uma carga horária equivalente ao de farmácia comunitária.

Orientação insuficiente dos estagiários

Devido ao volume de trabalho na DAM-UMM e à sobrecarga dos colaboradores, por vezes não houve disponibilidade para orientação dos estagiários. Isto limitou, de certo modo, as atividades que poderia ter realizado a mais, o que se refletiu na minha aprendizagem. Se houvesse mais orientação, talvez fosse possível fazer uma planificação mais cuidada das tarefas a desenvolver pelos estagiários.

Dependência dos requerentes para a progressão e finalização dos processos

Quando se analisa um pedido de alteração aos termos da AIM, é necessário confirmar toda a documentação submetida. Em várias ocasiões os gestores dos processos (como foi o meu caso) necessitam de fazer um pedido de elementos em falta, para que o processo possa ser aprovado. O problema é que é recorrente que os requerentes apenas respondam passado meses. Isto limita a aprendizagem e faz desperdiçar algum tempo do estágio.

Falhas nos recursos informáticos

As limitações a nível de *software* e *hardware* são uma fraqueza do Infarmed. São frequentes as falhas a nível das plataformas eletrónicas de gestão da informação, das bases de dados e do *e-mail*. Como estas são ferramentas indispensáveis para a realização das minhas tarefas, estes acontecimentos dificultavam a execução das minhas funções.

Formação insuficiente na fase pós-AIM dos medicamentos

Apesar de considerar uma grande vantagem a existência da unidade curricular de ARM no MICEF, a verdade é que esta foca maioritariamente os aspetos que concernem à fase pré-AIM. Este facto dificultou um pouco os primeiros dias de estágio, dificuldades essas que foram rapidamente ultrapassadas. Como se adquire pouca experiência prática académica, a minha sugestão seria a inclusão de uma vertente mais dinâmica nas aulas de ARM, incluindo debates de casos práticos que mimetizassem casos reais, visto que o Professor Doutor João José Sousa tem conhecimentos e experiência para que esta sugestão fosse plausível.

4.3 Oportunidades

Participação numa reunião plenária da CAM

Como parte integrante do estágio realizado, foi-me permitido assistir a uma reunião plenária da CAM, realizada no dia 11 de março de 2019. A CAM é um órgão consultivo do

Infarmed, constituído por avaliadores competentes que avaliam a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos e emitem pareceres relativos a estas questões. Nesta reunião assisti à aprovação de algumas alterações aos termos da AIM tipo II, inclusive alterações por mim agendadas para essa CAM. As alterações tipo II requerem aprovação por esta comissão, e posteriormente pelo Conselho Diretivo, e esta oportunidade permitiu-me perceber a complexidade de algumas decisões que são tomadas.

Acesso a formações

No decorrer do estágio, tive a oportunidade de participar na formação intitulada “Implementação de Dispositivos de Segurança”, orientada pela Dra. Maria Fernanda Ralha, diretora da Direção de Inspeção e Licenciamentos (DIL), que incidiu basicamente na temática da deteção de medicamentos falsificados no circuito legal do medicamento. Mais acrescento que o regime dos dispositivos de segurança surgiu com a diretiva 2011/62/UE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 8 de junho de 2011, que veio introduzir alterações à Diretiva 2001/83/CE que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano [16]. O acesso a esta formação permitiu-me adquirir novos conhecimentos relativamente a dispositivos de segurança, como por exemplo quais são os dispositivos de segurança que têm que ser implementados nas embalagens de medicamentos (Dispositivo de prevenção de adulterações e Identificador Único), quais os medicamentos que têm que ter estes dispositivos, o que devem fazer as autoridades quando detetam um medicamento falsificado/roubado, entre outros temas.

Perceção de Portugal como EMR (Estado Membro de Referência)

Portugal tem reforçado a sua atuação como EMR, aumentando assim a sua participação no Sistema Europeu de Avaliação de Medicamentos. A emissão rigorosa de pareceres técnico-científicos por parte do Infarmed na gestão dos processos de pedidos de AIM resulta num crescente grau de desempenho nesta área, consolidando assim a sua projeção e relevância em relação aos restantes Estados-membros e agências congéneres. Ainda assim, o Infarmed deve continuar a apostar na qualidade do seu trabalho e ter uma atitude proactiva no acompanhamento de processos, para que haja um crescente número de pedidos submetidos pela indústria farmacêutica ao Infarmed.

Carreira desafiante para os Farmacêuticos

A área regulamentar tem sido uma opção profissional em grande expansão por parte dos recém-formados. Ao contrário do que acontecia há alguns anos atrás, envergar pela Farmácia Comunitária tem sido muitas vezes a última opção dos alunos, dada a situação atual

da mesma devido a alterações na política do medicamento. Esta área revela-se, assim, uma alternativa profissional estimulante e entusiasmante, visto que tem uma vertente multifacetada.

4.4 Ameaças

BREXIT – saída do Reino Unido da UE

O Reino Unido pertence ao EEE (Espaço Económico Europeu), que é uma área geográfica criada por instâncias europeias para permitir a livre circulação dos bens, serviços, capitais e pessoas (que são as “quatro liberdades fundamentais” que sustentam o EEE). A possível saída do Reino Unido da UE implica a adoção de medidas que garantam a mais adequada transição para esta nova realidade. *“Esta saída leva à necessidade de transferência, por parte das empresas detentoras de AIM, de várias etapas do fabrico e da libertação de lotes dos medicamentos à data realizadas nesse Estado-Membro.”* Num cenário de saída sem acordo, no qual o Reino Unido passará a ser considerado um país "terceiro" da UE, os requisitos regulamentares passam a ser diferentes, demorando mais os medicamentos a serem aprovados. *“Os principais receios prendem-se com problemas nas redes de fornecimento que poderiam resultar num cenário de escassez de medicamentos e de material médico.”* Coloca-se a questão nos dispositivos médicos para testes rápidos, por exemplo, visto que são quase todos do Reino Unido e têm um prazo de validade curto. Pode haver falta de acesso aos medicamentos, porque os custos também passam a ser diferentes e o Reino Unido pode mesmo deixar de comercializar em Portugal [17].

Em estreito alinhamento com a UE, com os restantes Estados-membros e com a EMA, o Infarmed tem vindo a desenvolver ações preventivas para assegurar a continuidade do fornecimento dos medicamentos de uso humano e produtos de saúde no mercado português, de forma a cumprir a sua missão e salvaguardar a saúde pública [17].

Transposição heterogénea de diretivas

As diretivas são atos legislativos da UE que fixam um objetivo geral que todos os países da UE devem alcançar, sem ditar os meios para atingir esse objetivo. Cada país decide as regras a serem adotadas, logo, estas têm alguma flexibilidade de utilização, sendo que as mesmas devem ser transpostas pelos EM para o seu direito interno. O que acontece é que por vezes estas transposições para a lei nacional resultam em falta de homogeneidade nos procedimentos a nível europeu, conduzindo à necessidade de adoção de Regulamentos, que ao contrário das diretivas são auto-executivos, não tendo qualquer flexibilidade de utilização.

Falta de recursos humanos e acumulação de trabalho

Durante a minha passagem pela DAM apercebi-me de que há falta de recursos humanos. Apesar de haver um aumento do volume de trabalho, o Infarmed não tem conseguido preencher as suas lacunas de recursos humanos dadas as circunstâncias económicas em que o país se encontra. Esta problemática é reconhecida e é relatada no plano estratégico 2017-2019 do Infarmed [4]. Considero que esta realidade representa uma ameaça não só ao posicionamento externo desta AC (podendo transparecer falta de competência dos profissionais), como ao próprio trabalho realizado pelo Infarmed já que, devido à constante alteração do panorama regulamentar dos medicamentos, são frequentes as situações em que a documentação respetiva ao pedido submetido se encontra desatualizada. Em suma, a falta de recursos humanos teve um impacto negativo no meu estágio, porque como isto leva a que os colaboradores tenham dificuldade em cumprir as suas funções, limitou a sua disponibilidade para me ensinar e para responder às dúvidas que iam surgindo.

5 | Considerações Finais

A FFUC oferece variadas ferramentas aos seus alunos, com o intuito de construir profissionais de saúde de excelência. Pela abrangência da função Farmacêutica, é natural que a vertente teórica seja privilegiada. Contudo, a realização deste estágio curricular é uma experiência prática essencial para ter uma perceção do mundo profissional. O valor do farmacêutico é enorme na área da saúde. Sendo o especialista do medicamento e agente da saúde pública, o farmacêutico contacta com tudo o que é intrínseco ao medicamento, desde a sua descoberta até à vigilância durante o seu ciclo de vida. Neste sentido, é de realçar que este estágio curricular permitiu-me adquirir competências a nível regulamentar que serão uma mais-valia para o meu futuro. Esta oportunidade oferecida pela FFUC revelou-se extremamente enriquecedora, a nível da integração no contexto regulamentar do setor da saúde. Tive o privilégio de ser orientada e formada por profissionais competentes, o que resultou na consolidação de conhecimentos e na aquisição de novos conceitos e valências.

A apreciação global do estágio curricular é bastante positiva. Acrescento que foi sem dúvida uma experiência compensatória, tanto a nível pessoal como profissional, tendo em conta que melhorei diversas competências como o trabalho em equipa, a capacidade de resolução de problemas e a autonomia.

Apesar da realidade profissional não se apresentar atualmente promissora, cabe-me a mim, como futura Farmacêutica, criar oportunidades para que me possa destacar e ocupar um lugar relevante neste setor.

6 | Bibliografia

- [1] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Decreto-Lei n.º 288/2001, de 10 de novembro. Lisboa: Diário da República. 1.ª Série, n.º261, p. 7150-7165.
- [2] INFARMED, I.P. - INFARMED: O Futuro Preparado. Porto, Portugal: Porto Editora, 2015, ISBN 978-972-0-06359-5.
- [3] INFARMED, I.P. - Apresentação. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 27 de abril de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/apresentacao>
- [4] INFARMED, I. P. - Plano Estratégico 2017-2019. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 27 de abril de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1269504/Plano+Estratégico+2017-2019/1f490fe2-998a-4e64-bca9-939862f34217>
- [5] INFARMED, I. P. - Organograma do INFARMED, I. P. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 27 de abril de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/1905196/Organograma+2017/c8343cd0-df7f-490c-84ef-15db7d43dfc2>
- [6] MINISTÉRIOS DAS FINANÇAS E DA SAÚDE - Portaria n.º 306/2015. Lisboa: Diário da República. 1.ª Série, n.º186, p. 8433-8439.
- [7] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Deliberação n.º 1991/2015. Lisboa: Diário da República. 2.ª Série, n.º 215, p. 31753-31756.
- [8] INFARMED, I.P. - Alterações aos Termos de AIM / Transferência de Titular. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 4 de maio de 2019]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano/autorizacao-de-introducao-no-mercado/alteracoes_transferencia_titular_aim
- [9] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Decreto-Lei n.º 128/2013, de 5 de setembro. Lisboa: Diário da República. 1.ª Série, n.º171, p. 5551.
- [10] ICH-CTD:ICH [Acedido a 23 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.ich.rg/products/ctd.html>
- [11] INFARMED, I. P - Manual do Utilizador Externo SMUH-ALTER. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 24 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/SMUH-ALTER-Externo-Manual-Utilizador-PT-Versao-2-Agosto2013.pdf/9b502d4e-c0f7-4db3-a297-d1237e4727d2>

[12] EUROPEIA, C. - Regulamento (CE) n.º 1234/2008 da Comissão, de 24 de novembro de 2008, relativo à análise das alterações dos termos das autorizações de introdução no mercado de medicamentos para uso humano e medicamentos veterinários, alterado pelo Regulamento (UE) n.º 712/2012 da Comissão de 3 de agosto de 2012. L 334 (2008), 1-32.

[13] CMDh - Variation Procedure. [Acedido a 24 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.hma.eu/96.html>

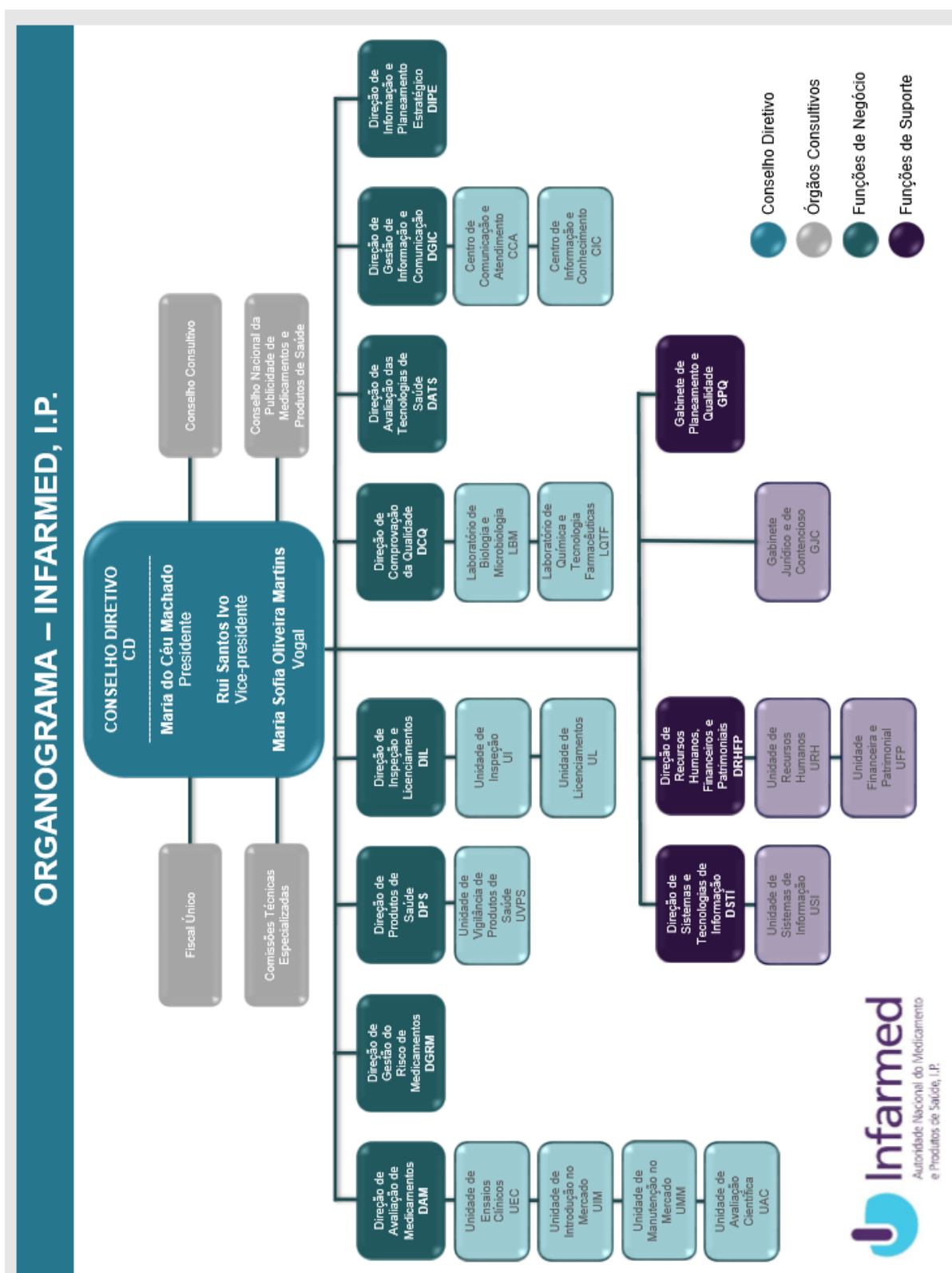
[14] RENAULT, V. - *SWOT Analysis: Strengths, Weaknesses, Opportunities, and Threats* [Acedido a 24 de maio de 2019]. Disponível em: <http://ctb.ku.edu/en/table-ofcontents/assessment/assessing-community-needs-and-resources/swot-analysis/main>

[15] INFARMED, I.P. - Mapa detalhado. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 29 de maio de 2019]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/CONTACTOS/MAPA/MAPA_DETALHADO

[16] PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO - Diretiva 2011/62/eu, de 8 de junho de 2011 [Acedido a 29 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:174:0074:0087:PT:PDF>

[17] INFARMED, I.P. - Brexit - Informações relevantes. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 31 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/brexit?fbclid=IwAR0VthlhWZsKuPhreGoYIzXaofCcWP8TnfFI GIV3laLsEjfiDRAYqyHP6w>

Anexo I. Organograma do Infarmed.



Anexo 2. Funções da Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM).

ANEXO

ESTATUTOS DO INFARMED — AUTORIDADE NACIONAL DO MEDICAMENTO E PRODUTOS DE SAÚDE, I. P.

Artigo 1.º

Estrutura

1. A organização interna do INFARMED, I. P., é constituída pelas seguintes unidades orgânicas:

- a) Direção de Avaliação de Medicamentos;
- b) Direção de Gestão do Risco de Medicamentos;
- c) Direção de Produtos de Saúde;
- d) Direção de Inspeção e Licenciamentos;
- e) Direção de Comprovação da Qualidade;
- f) Direção de Avaliação das Tecnologias de Saúde;
- g) Direção de Gestão de Informação e Comunicação;
- h) Direção de Sistemas e Tecnologias de Informação;
- i) Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais;
- j) Gabinete de Planeamento e Qualidade;
- k) Direção de Informação e Planeamento Estratégico;
- l) Gabinete Jurídico e de Contencioso.

2. Por deliberação do conselho diretivo podem ser criadas, modificadas ou extintas até catorze unidades orgânicas flexíveis, integradas ou não nas direções a que se refere o número anterior, sendo as respetivas competências definidas naquela deliberação, a qual é objeto de publicação no *Diário da República*.

3. [Revogado.]

4. [Revogado.]

Artigo 2.º

Cargos dirigentes intermédios

1. As direções e o Gabinete de Planeamento e Qualidade são dirigidos por diretores de direção, cargos de direção intermédia de 1.º grau.

2. O Gabinete Jurídico e de Contencioso e as unidades orgânicas flexíveis são dirigidos por diretores de unidade, cargos de direção intermédia de 2.º grau.

Artigo 3.º

Direção de Avaliação de Medicamentos

À Direção de Avaliação de Medicamentos, abreviadamente designada por DAM, compete:

a) Assegurar as atividades necessárias aos procedimentos de registo, avaliação da sua eficácia, segurança e qualidade, e de autorização de introdução no mercado de medicamentos de uso humano e à sua manutenção no mercado, bem como a gestão desses procedimentos;

b) Gerir as atividades relativas à intervenção do INFARMED, I. P., no procedimento de reconhecimento mútuo e descentralizado, nomeadamente como Estado membro de referência e nos procedimentos centralizado e de arbitragem comunitária;

c) Emitir pareceres de âmbito técnico-científico sobre a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos de uso humano, bem como sobre os produtos que incorporam substâncias ativas ou produtos biológicos;

d) Assegurar o desenvolvimento das atividades inerentes à avaliação da qualidade, eficácia e segurança dos medica-

mentos, incluindo os experimentais, nas áreas da química, da biologia, da tecnologia farmacêutica e da toxicologia, bem como no âmbito de ensaios clínicos e avaliação de relatórios periódicos de segurança;

e) Assegurar as atividades necessárias aos procedimentos de avaliação e autorização dos pedidos de autorização de utilização especial e excecional, bem como de importações paralelas, de medicamentos de uso humano;

f) Assegurar as atividades inerentes à adequada integração e participação no âmbito do sistema da União Europeia relativo à avaliação e supervisão de medicamentos de uso humano, incluindo a articulação com a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), a Comissão Europeia e as demais instituições europeias;

g) Assegurar as atividades necessárias ao cumprimento das normas aplicáveis à autorização e condução de ensaios clínicos, bem como o controlo da observância das boas práticas clínicas na sua realização, incluindo a gestão dos procedimentos tendentes a essa autorização, e suas alterações, e dos de controlo e monitorização desses ensaios;

h) Gerir os procedimentos relativos à concessão de autorizações de utilização especial dos medicamentos experimentais no âmbito dos ensaios clínicos de uso humano;

i) Assegurar a articulação com a comissão de avaliação de medicamentos e o respetivo secretariado;

j) Assegurar a articulação com os sistemas de informação nacionais e europeus no âmbito das suas competências;

k) Assegurar a elaboração de normas e orientações destinadas aos utilizadores dos serviços do INFARMED, I. P., no âmbito das suas atribuições;

l) Coordenar as atividades de normalização e harmonização de conceitos, definições e terminologias relacionadas com os medicamentos;

m) Colaborar nas atividades de aconselhamento regulamentar e científico;

n) Assegurar a representação a nível nacional e internacional do INFARMED, I. P., no âmbito das suas atribuições, nomeadamente nas estruturas e grupos de trabalho comunitários e junto da Agência Europeia de Medicamentos, no âmbito das suas competências.

Artigo 4.º

Direção de Gestão do Risco de Medicamentos

À Direção de Gestão do Risco de Medicamentos, abreviadamente designada por DGRM, compete:

a) Assegurar a coordenação e funcionamento do Sistema Nacional de Farmacovigilância de Medicamentos de Uso Humano, designadamente no que respeita à recolha, avaliação e divulgação da informação sobre as suspeitas de reações adversas dos medicamentos, à análise de relações de causalidade entre medicamentos e reações adversas e à identificação precoce de problemas de segurança com a utilização de medicamentos, bem como a vigilância de ensaios clínicos, através da colheita, registo e avaliação dos acontecimentos adversos ocorridos durante os mesmos;

b) Gerir o sistema de alertas de farmacovigilância da União Europeia e assegurar a participação no programa de monitorização de medicamentos da Organização Mundial de Saúde (OMS);

c) Assegurar a monitorização de segurança dos medicamentos, através dos planos de gestão de risco, bem como emitir pareceres sobre esses planos;

Artigo 4.º

Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM)

1 — Sem prejuízo do estabelecido nos artigos 2.º e 3.º, a estrutura da DAM assenta num modelo matricial, de três subunidades orgânicas especializadas por áreas de intervenção e uma de carácter transversal que assegura serviços às demais, que são as seguintes:

a) Subunidades orgânicas especializadas por áreas de intervenção:

- i) Unidade de Ensaio Clínico (UEC);
- ii) Unidade de Introdução no Mercado (UIM);
- iii) Unidade de Manutenção no Mercado (UMM);

b) Subunidade orgânica de carácter transversal: Unidade de Avaliação Científica (UAC).

2 — À UEC compete:

a) Assegurar as atividades necessárias à autorização da realização de ensaios clínicos com medicamentos, bem como a autorização das alterações substanciais a esses ensaios;

b) Garantir o acompanhamento da realização dos ensaios clínicos, de acordo com os termos das autorizações, sem prejuízo das competências da DIL e da DGRM.

3 — À UIM compete:

a) Assegurar as atividades necessárias ao registo ou à autorização, com vista à introdução de medicamentos no mercado;

b) Assegurar as atividades necessárias à autorização de utilização especial e excecional de medicamentos e de importações paralelas.

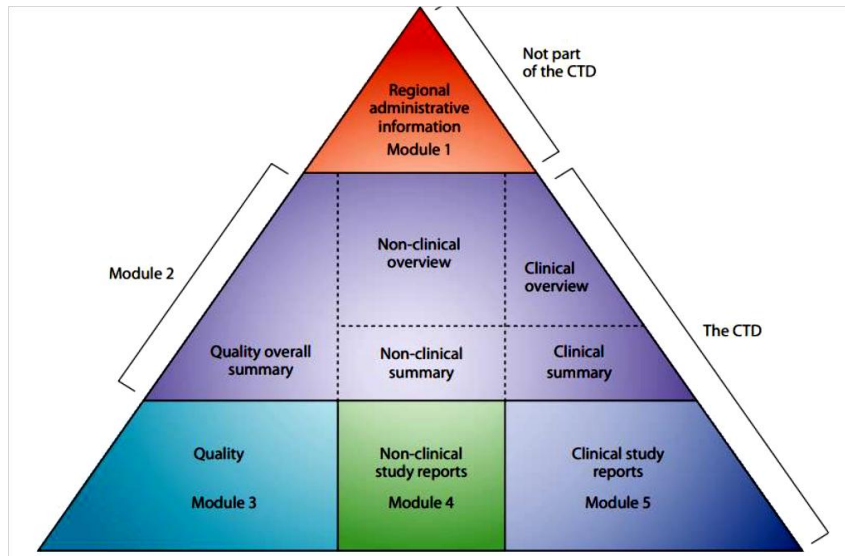
4 — À UMM compete assegurar as atividades necessárias à manutenção no mercado de medicamentos já registados ou autorizados, designadamente as que visem a autorização de alterações, renovações, bem como de revogação ou declaração da caducidade, de registos ou autorizações de introdução no mercado de medicamentos.

5 — À UAC compete:

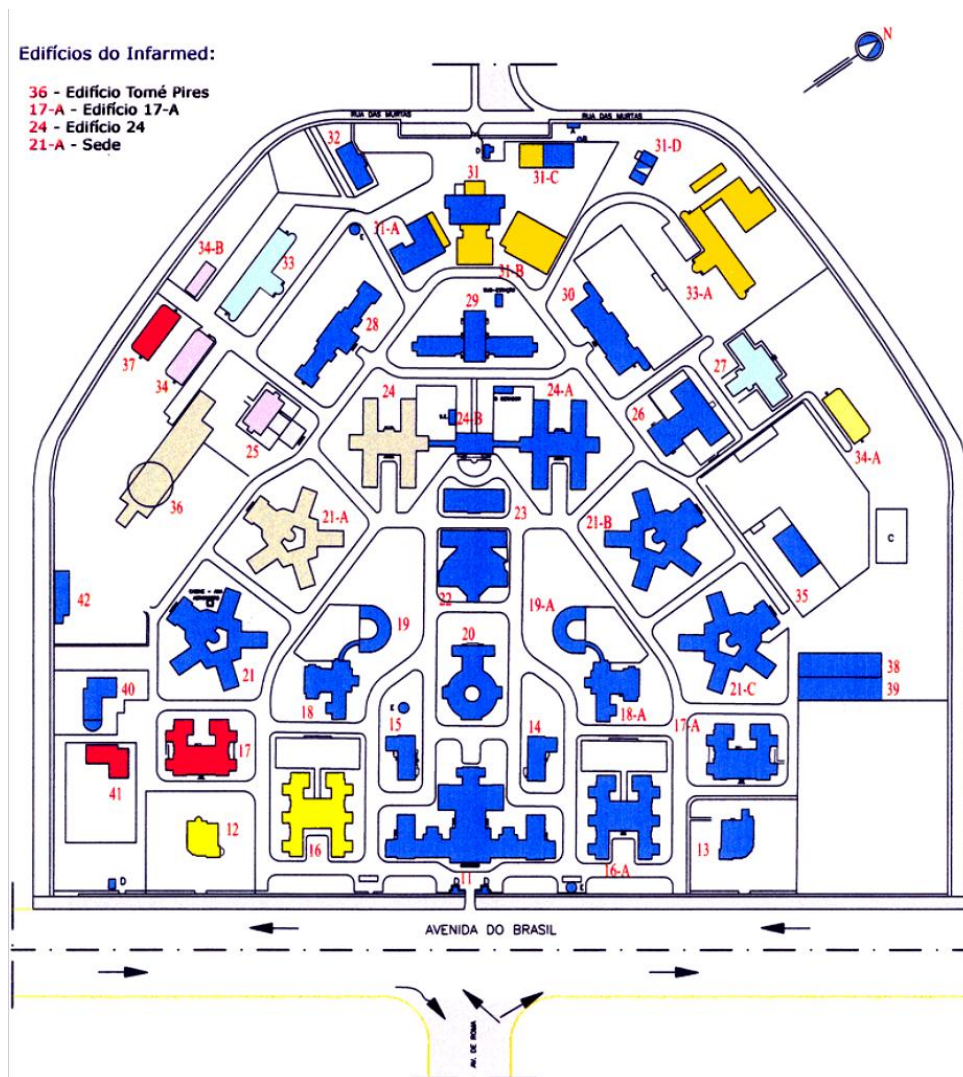
a) Assegurar as atividades necessárias à avaliação da eficácia, segurança e qualidade de medicamentos, incluindo os experimentais, com vista à sua investigação e introdução, ou manutenção, no mercado, bem como emitir pareceres relacionados com aquelas atividades;

b) Assegurar, designadamente às demais subunidades orgânicas da DAM, os serviços de avaliação solicitados.

Anexo 4. Estrutura do CTD (Common Technical Document).



Anexo 5. Mapa detalhado do Parque de Saúde de Lisboa.



PARTE II

RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA - FARMÁCIA AVENIDA



Carina Alexandra Teixeira Monteiro

Orientador: Dr. Manuel Felisberto

“A principal responsabilidade do farmacêutico é para a saúde e o bem-estar do doente e do cidadão em geral, promovendo o direito a um tratamento com qualidade, eficácia e segurança.”

In Boas Práticas Farmacêuticas para a Farmácia Comunitária - Ordem dos Farmacêuticos

Lista de Abreviaturas

ANF - Associação Nacional das Farmácias

BPF - Boas Práticas Farmacêuticas

BZD - Benzodiazepinas

DCI - Denominação Comum Internacional

DM - Dispositivos Médicos

FA - Farmácia Avenida

FEFO - First Expired, First Out

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

FIFO - First In, First Out

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

MM - Medicamentos Manipulados

MNSRM - Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

MSRM - Medicamentos Sujeitos a Receita Médica

PTS - Programa de Troca de Seringas

SNS - Serviço Nacional de Saúde

SWOT - Strengths (Forças), Weaknesses (Fraquezas), Opportunities (Oportunidades) e Threats (Ameaças)

VIH - Vírus da Imunodeficiência Humana

I | Nota Introdutória

O Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC) culmina, obrigatoriamente, com a realização de um estágio em Farmácia Comunitária. Este estágio é de extrema importância, pois proporciona o contacto inicial com a realidade profissional, estimulando o desenvolvimento de competências necessárias para o desempenho da profissão de forma autónoma, responsável e competente.

O farmacêutico é um elemento fundamental na prestação de cuidados de saúde à sociedade, sendo reconhecido como o especialista do medicamento e agente de saúde pública. Neste sentido, existe um código deontológico que deve ser respeitado aquando do exercício da atividade farmacêutica. “*O ato farmacêutico é da exclusiva competência e responsabilidade dos farmacêuticos*”, sendo que nele se incluem diversas atividades que dizem respeito aos medicamentos de uso humano e veterinário, dispositivos médicos, bem como a análises toxicológicas, hidrológicas e bromatológicas [1]. Ao farmacêutico comunitário cabe recorrer de forma plena aos seus conhecimentos, de forma a saber ouvir, comunicar, informar e aconselhar os utentes, com o intuito de sensibilizá-los para a relevância da adoção de comportamentos de saúde e utilização racional dos medicamentos. Estas valências demonstram-se fundamentais na conjuntura atual, em que os utentes reconhecem a farmácia como um local de confiança.

A escolha do local do estágio baseou-se numa prévia experiência enriquecedora aquando da realização de um estágio extracurricular. O profissionalismo de toda a equipa tornam esta farmácia num local de excelência de prestação de cuidados de saúde, e, como tal, todas estas variantes foram fulcrais para a minha decisão. O estágio curricular decorreu entre os meses de abril e julho de 2019, na Farmácia Avenida (Lamego), sob a orientação do Dr. Manuel Felisberto.

O presente relatório resume uma reflexão crítica sobre os conhecimentos técnico-científicos e pessoais adquiridos e sobre as atividades desenvolvidas ao longo dos quatro meses de estágio. Esta reflexão baseia-se numa análise *SWOT*, onde pretendo explicitar os pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças que marcaram o mesmo. Acrescento que ficará salvaguardado qualquer assunto alvo de confidencialidade ou sigilo profissional.

2 | Enquadramento – Farmácia Avenida

A Farmácia Avenida (FA) abriu as portas ao público na década de 60. Tem dois pisos que individualizam diversas áreas, de modo a criar o máximo conforto para o utente. O andar de cima está dividido em: zona de acesso ao público (com 5 postos de atendimento); gabinete de atendimento personalizado para avaliação da pressão arterial e parâmetros bioquímicos/sala de consultas de nutrição; áreas de exposição de lineares (produtos de cosmética, dietéticos, infantis, de puericultura, etc.); gabinete de direção técnica; casa de banho; zona de receção de encomendas e zona de arrumação de medicamentos em gavetas. O piso inferior divide-se em 3 áreas: armazém de medicação excedente; sala de convívio/descanso; laboratório de manipulados atualmente fora de funcionamento.

A localização central da FA maximiza a afluência de utentes durante todo o dia. O facto de a farmácia não encerrar durante o período de almoço é uma mais-valia para clientes que trabalham nas proximidades, visto que desta forma estes podem deslocar-se à farmácia neste período e rentabilizar o seu tempo livre.

Lamego pertence à sub-região do Douro (província tradicional de Trás-os-Montes e Alto Douro) e é considerada uma cidade histórica e monumental, o que leva muitas vezes a que os turistas procurem os serviços da FA.

Tabela I. Parâmetros de contextualização da Farmácia Avenida.

Localização	Praceta Dr. Veiga de Macedo 22-28; 5100-103 (Centro da cidade)
Horário de funcionamento*	8.30h-19.30h (ininterruptamente em dias úteis); 9h-13h (sábado)
Direção Técnica	Dr. ^a Maria Teresa Saraiva Rego
Farmacêuticos	Dr. ^a Maria Teresa Saraiva Rego; Dr. Manuel Felisberto; Dr. ^a Ângela Barros; Dr. ^a Mariana Almeida
Técnicos de Diagnóstico e Terapêutica	Dr. ^a Catarina Ribeiro; Dr. ^a Sara Martinho; Dr. ^a Cláudia Gomes; Dr. ^a Sandra Moura
Auxiliar operacional	Ana Maria Pinto
População abrangida	Todas as faixas etárias e classes socioeconómicas, com enfoque para a população idosa

*Para além do normal horário de funcionamento, cerca de uma vez por semana (inserida no regime de rotatividade das farmácias de Lamego) está de serviço de forma ininterrupta, desde o horário de abertura até ao horário de encerramento do dia seguinte.

3| Funções desempenhadas

No presente estágio foi-me dada a oportunidade de realizar uma série de tarefas, resumidamente descritas no cronograma do Anexo I, de entre as quais destaco as seguintes:
– Receção, conferência e armazenamento de encomendas (esta foi a minha primeira tarefa,

- que permitiu uma maior consciencialização dos nomes comerciais dos medicamentos);
- Prestação de serviços aos utentes - determinação de parâmetros fisiológicos e bioquímicos (pressão arterial, glicémia capilar, colesterol total e triglicéridos); os resultados obtidos na pressão arterial eram interpretados de acordo com a tabela do Anexo 2 [2];
 - Atendimento ao balcão - dispensa de medicamentos sujeitos e não sujeitos a receita médica (MSRM e MNSRM), dispositivos médicos (DM) e outros produtos farmacêuticos;
- As regras de dispensa, segundo a validade, instituídas na FA são:
- *First Expired, First Out (FEFO)* - para medicamentos ou outros produtos com validade
 - *First In, First Out (FIFO)* - principalmente em produtos de cosmética que, pela ausência da mesma, implica que a dispensa seja de acordo com a ordem de chegada à FA;
- Avaliação crítica de prescrições médicas;
 - Prestação de aconselhamentos na área de cosmética, dietética e alimentação especial, puericultura e obstetrícia, fitoterapia e suplementos, e produtos de uso veterinário (as marcas de cosmética mais significantes na FA são Avène®, Bioderma®, Galénic®, Vichy®);
 - Conferência e organização do receituário;
 - Controlo de prazos de validade e confirmação física de *stock*.

3.1 Caso Prático

Tosse: Um utente do sexo masculino, com cerca de 30 anos, deslocou-se à FA e referiu que andava com episódios de tosse há 2 dias. Foi-lhe questionado se a tosse era seca ou produtiva, se tomava alguma medicação e se era diabético (devido aos xaropes com açúcar). O utente referiu ainda que tinha dores de garganta. Posto isto, foi-lhe aconselhada a toma de Bisolvon® (bromexina – mucolítico) para a tosse, e para a dor de garganta foi-lhe dispensado Strepfen® (flurbiprofeno – anti-inflamatório). Em último lugar, foram-lhe recomendadas algumas medidas não farmacológicas (ex: boa hidratação, de forma a facilitar a libertação da expetoração).

4 | Análise SWOT

A análise *SWOT* engloba duas dimensões - a interna (*strengths; weaknesses*) e a externa (*opportunities; threats*). Apresento, de seguida, a análise *SWOT* relativa ao meu estágio na Farmácia Avenida. Transmitirei com espírito crítico e de forma contextualizada os aspetos mais relevantes do meu estágio, salientando a importância deste no término da formação contínua do MICEF.

Tabela 2. Resumo dos pontos abordados na análise SWOT.

Pontos Fortes (Dimensão interna)	Pontos Fracos (Dimensão interna)
<ul style="list-style-type: none">- Filosofia <i>Kaizen</i>- Sistema informático- Competência e afabilidade da equipa- Contacto com a receita eletrónica desmaterializada- Prestação de serviços farmacêuticos aos utentes- Outras valências da FA- Desenvolvimento de autonomia na cedência de MNSRM	<ul style="list-style-type: none">- Lacunas no plano curricular do MICF- Medicamentos manipulados- Reconhecimento de marcas comerciais através da prescrição por DCI- Insegurança inicial
Oportunidades (Dimensão externa)	Ameaças (Dimensão externa)
<ul style="list-style-type: none">- Acesso a formações- Grande afluência da população- Proximidade ao utente	<ul style="list-style-type: none">- Medicamentos esgotados ou rateados – uma problemática- Competitividade do mercado- Utentes de idade avançada- Conjuntura económica atual

4.1 Pontos Fortes

Filosofia *Kaizen*

O estágio curricular na FA deu-me a possibilidade de conhecer a filosofia *Kaizen*. Esta filosofia assenta em 9 pontos, como ilustrado no Anexo 3, e “*baseia-se nos princípios socioculturais do oriente, que exigem um grande comprometimento de todos os indivíduos que fazem parte de uma empresa, consistindo numa forma de gestão orientada para a maximização da produtividade e da rentabilidade, e consequente redução de custos*” [3].

Sistema informático

O sistema informático utilizado na FA é o *Sifarma2000*[®], criado pela *Glantt Farma*. Este *software* constitui um instrumento de suporte ao profissional de saúde para um ato centrado no utente, otimizando os procedimentos de aconselhamento e dispensa. Para além disso, é fulcral para a gestão diária contabilística e financeira da farmácia e do circuito do medicamento, pois auxilia o pedido e receção de encomendas, o controlo de *stocks* e de prazos de validade, o controlo de estupefacientes, psicotrópicos e benzodiazepinas (BZD), a escolha do organismo de comparticipação (ver Anexo 4) e permite a consulta de informações sobre os medicamentos e os utentes. Enquanto estagiária, este *software* constituiu uma mais-valia no atendimento, no sentido em que no ato da dispensa, permite o acesso a diversa informação científica: composição, indicações, posologia, reações adversas, contraindicações e interações. Apesar de ser muito completo, o seu funcionamento é muito intuitivo o que me permitiu familiarizar facilmente com o programa. É de salientar que este sistema não substitui, de maneira alguma, a importância que o farmacêutico tem como

especialista do medicamento e agente de saúde pública. Considero, assim, um ponto forte do meu estágio, pois permitiu a realização das tarefas do quotidiano com grande facilidade, rapidez, e efetividade.

Competência e afabilidade da equipa

Os recursos humanos são uma base essencial em qualquer empresa, portanto, de forma a assegurar o seu bom funcionamento, é necessário ajustar a equipa em termos de quantidade e qualidade. A equipa de FA é constituída por vários profissionais que garantem uma prestação de cuidados farmacêuticos com qualidade e competência (ver Tabela I). Não há dúvidas acerca do quão é mais fácil trabalhar diariamente com uma equipa acessível, disposta a partilhar conhecimentos, e capaz de criar um agradável ambiente laboral. Foi possível encontrar precisamente esse ambiente na FA, que me permitiu desenvolver competências profissionais e pessoais. O espírito de entreatajuda na resolução de problemas revelou-se, assim, uma mais-valia no meu estágio.

Contacto com a receita eletrónica desmaterializada

A receita médica pode ser definida como um documento que permite a comunicação entre o médico, o farmacêutico e o utente. Atualmente estão em vigor três tipos de receita médica: manual, eletrónica materializada e eletrónica desmaterializada (ou receita sem papel) (ver Anexos 5 e 6). Não obstante, como pode ser verificado no Anexo 7, em todas elas existem itens a verificar na sua validação [4]. A legislação correspondente à prescrição de medicamentos e outros produtos de saúde foi recentemente alterada, sendo incentivada a prescrição por DCI, de modo a ser focada a escolha farmacológica. Contudo, existem justificações técnicas para as exceções à prescrição por DCI. Estas exceções têm que estar inequivocamente descritas na receita e são: Medicamentos com margem ou índice terapêutico estreito; Reação adversa prévia; Continuidade de tratamento superior a 28 dias. Nas alíneas a) e b) é proibido dispensar outro que não seja a denominação comercial prescrita. No caso da alínea c) pode ser dispensado outro do mesmo grupo homogéneo, desde que o P.V.P. deste seja inferior ao indicado na receita [5].

Devido à legislação que vigora atualmente, a dispensa de medicação em formato manual é cada vez menos frequente nas farmácias. Existem também exceções, sendo que as justificações são assinaladas no quanto superior direito e são: falência informática; inadaptação do prescritor; prescrição no domicílio; até 40 receitas/mês. Em cada receita manual pode serem prescritos até 4 medicamentos diferentes, num total de 4 embalagens por receita, sendo que no máximo só podem ser 2 embalagens por medicamento. Em casos de embalagens unitárias, podem ser prescritas até 4 embalagens do

mesmo medicamento. A dispensa através da receita médica manual comporta mais erros, uma vez que a introdução dos fármacos é feita manualmente [5].

Através do Despacho n.º 2935-B/2016, a prescrição da receita eletrónica desmaterializada passou a ter carácter obrigatório para todo o Serviço Nacional de Saúde (SNS), a partir do dia 1 de abril de 2016 [6]. Este modelo eletrónico tem inúmeras vantagens: permite que sejam prescritos num único receituário todos os produtos de saúde (o que antes não era possível); permite ao utente optar no ato da dispensa se quer aviar toda a medicação prescrita ou apenas parte dela, sendo que o resto pode ser aviado em datas e estabelecimentos distintos; permite que o utente possa ter a opção de receber o guia de tratamento em suporte de papel, ou que receba os códigos de acesso, dispensa e direito de opção por mensagem no telemóvel; diminui o tempo gasto em atividades de *back office* como o receituário. Devido a todas estas razões, considero que o contacto com a receita sem papel foi um ponto forte do meu estágio curricular.

Prestação de serviços farmacêuticos aos utentes

A diversidade de serviços prestados na FA constituiu para mim, enquanto estagiária, um ponto bastante positivo. Para além da cedência de medicamentos e outros produtos de saúde, merece destaque na FA a possibilidade de medição e controlo da pressão arterial (o serviço mais requisitado), a determinação de parâmetros bioquímicos como a glicémia capilar, triglicéridos e colesterol total, a administração de injetáveis, e ainda a existência de consultas de nutrição semanais. No final da prestação de cada serviço (à exceção das consultas de nutrição que são realizadas por um profissional da área), estabelecia um diálogo com o utente acerca do seu estilo de vida, a fim de recomendar alterações benéficas para a sua saúde tais como praticar exercício físico, reduzir o consumo de sal, beber água regularmente e adotar uma dieta o mais equilibrada possível.

A FA dispõe ainda do Programa de Troca de Seringas (PTS), cujo objetivo principal é *“prevenir infeções pelo VIH e pelos vírus das Hepatites B e C, por via sexual, endovenosa e parentérica, nas pessoas que utilizam drogas injetáveis”*. O kit “Redução de riscos” inclui duas seringas+ agulhas, um preservativo, dois filtros, dois toalhetes desinfetantes, dois recipientes, duas ampolas de água bidestilada e duas carteiras de ácido cítrico (ver Anexo 8) [7].

Outras valências da FA

VALORMED

A FA faz a recolha de resíduos de medicamentos fora de uso e embalagens vazias em colaboração com a VALORMED – sociedade sem fins lucrativos, criada em 1999, que

resultou da colaboração entre a Indústria Farmacêutica, Distribuidoras e as próprias Farmácias [8]. São recolhidos resíduos de medicamentos fora de prazo ou já não utilizados, bem como materiais utilizados no seu acondicionamento, embalagem e administração (folhetos informativos, cartonagens vazias, blisters, frascos, copos, colheres, conta gotas, seringas doseadoras, cânulas, etc.) [9]. Existe um contentor na FA onde se colocam todos os resíduos entregues pelos utentes. O contentor é selado quando está cheio e posteriormente os armazenistas procedem à sua recolha, ficando na farmácia o duplicado da “ficha do contentor”.

Cartão Saúde - Cartão das Farmácias Portuguesas

A FA é aderente ao cartão saúde, que faz parte do programa “Farmácias Portuguesas” da Associação Nacional das Farmácias (ANF). Este cartão pode ser considerado como uma forma de fidelização de clientes, pois permite que os utentes acumulem pontos consoante a compra realizada. A compra de MSRM origina a atribuição de 1 ponto por dia, sendo que os produtos cosméticos e MNSRM permitem acumular mais pontos. Estes pontos podem ser trocados por produtos de saúde identificados no respetivo catálogo, ou podem originar vales de desconto na compra. Durante o estágio, foram inúmeras as vezes que atribuí e rebati pontos, trazendo vantagens para os utentes que, com este cartão, viram muitas vezes a sua despesa na farmácia reduzida.

Desenvolvimento de autonomia na cedência de MNSRM

Com a crescente divulgação de publicidade, a ida ao médico é cada vez menos a primeira opção do utente que procura uma solução rápida para os seus problemas de saúde. É neste contexto que a cedência de MNSRM e a prática de indicação farmacêutica se revestem da maior importância, sendo esta última definida nas BPF como o “*ato profissional pelo qual o farmacêutico se responsabiliza pela selecção de um medicamento não sujeito a receita médica e/ou indicação de medidas não farmacológicas, com o objetivo de aliviar ou resolver um problema de saúde considerado como um transtorno menor ou sintoma menor, entendido como problema de saúde de carácter não grave, autolimitante, de curta duração, que não apresente relação com manifestações clínicas de outros problemas de saúde do doente*” [10]. A indicação farmacêutica pressupõe que se faça uma entrevista ao utente (ver Anexo 9) por forma a identificar as suas queixas, para que o farmacêutico possa posteriormente intervir, abordando algumas medidas não farmacológicas, em associação ou não com MNSRM (ou encaminhar para o médico). Se forem cedidos MNSRM, o esquema terapêutico deve ser o mais simples possível para que haja adesão à terapêutica [10].

Fui diariamente confrontada com situações em que foi necessário, depois de avaliar

cuidadosamente todo o quadro clínico, dispensar MNSRM ao utente, sendo que isto contribuiu para que me tornasse cada vez mais autónoma neste tipo de atendimentos.

4.2 Pontos Fracos

Lacunas no plano curricular do MICEF

Durante o meu estágio curricular, deparei-me com situações que não consegui executar com a autonomia que pretendia, devido à existência de algumas lacunas no plano curricular do MICEF. Destaco essencialmente as unidades curriculares de Dermofarmácia e Cosmética e Preparações de Uso Veterinário, cuja adequação à prática profissional constituiu entraves à minha *performance* diária. Na minha opinião, os conhecimentos transmitidos nestes casos foram insuficientes para a prestação de aconselhamentos consistentes. Relativamente a Dermofarmácia e Cosmética, saliento que existe uma enorme variedade de marcas e produtos, o que dificultou inicialmente a minha resposta face a algumas solicitações. O mesmo se passa com produtos de uso veterinário. Cada vez mais utentes se deslocam especificamente à farmácia para adquirir este tipo de produtos. A FA tem uma zona reservada a produtos veterinários, sendo a maioria deles desparasitantes internos e externos, e apesar de existir uma unidade curricular sobre o assunto, considero que esta não está adequada à prática profissional. Quanto a outras áreas que na minha opinião são abordadas muito superficialmente destaco a puericultura e obstetrícia e os MNSRM de uso auricular o ocular. Não obstante, todas as dificuldades foram facilmente colmatadas com o auxílio da equipa da FA, que se demonstrou sempre disponível para me ajudar a ultrapassar as mesmas.

Medicamentos manipulados

O Artigo 1.º do Decreto-Lei nº95/2004 de 22 de abril, que regula a prescrição e preparação de medicamentos manipulados (MM), define medicamento manipulado como “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico” [11]. Devido ao crescente desenvolvimento da indústria farmacêutica, o pedido de preparação de MM nas farmácias diminuiu nos últimos anos.

A FA escolheu não produzir MM nas suas instalações, sendo solicitado, sempre que necessário, à Farmácia Lordelo (Vila Real) a sua preparação. Considero um ponto fraco pelo simples facto de que ao longo do estágio não tive a oportunidade de aplicar conhecimentos de farmácia galénica na preparação destes.

Reconhecimento de marcas comerciais através da prescrição por DCI

Ao longo da formação académica, os fármacos são lecionados por DCI e não por marca comercial. Numa fase inicial de estágio foi relativamente difícil associar ambos, contudo, a receção de encomendas, uma das primeiras tarefas por mim desempenhadas, foi útil para me ajudar a familiarizar com as marcas comerciais dos medicamentos. Apesar da prescrição por DCI ser uma mais-valia, na medida em que dá um maior leque de escolha ao utente, traz o inconveniente deste não estar familiarizado com a mesma. Gera-se assim uma confusão nos utentes, visto que não ficam esclarecidos em relação às prescrições médicas, podendo resultar em duplicação da terapêutica (casos em que tomam em simultâneo o medicamento de marca e o genérico).

Insegurança inicial

Apesar de ter realizado um estágio de verão em farmácia comunitária, senti uma pequena insegurança quando iniciei o atendimento ao público. O relacionamento interpessoal com os utentes e a adaptação de linguagem nunca constituíram um entrave, contudo, existiu inicialmente o receio de transmitir informações incorretas ou não cumprir corretamente os procedimentos informáticos. O público é cada vez mais impaciente e exigente, pelo que um bom serviço é visto atualmente como um atendimento de qualidade no menor tempo possível. Apesar do MICEF nos proporcionar formação em diversas áreas, a ausência de estágios obrigatórios ao longo do mesmo, traz dificuldades quando nos deparamos com a realidade diária de uma farmácia comunitária. Apesar de tudo, com a prática, rapidamente adquiri a confiança necessária para dar resposta a todas as solicitações dos utentes. Apesar de apontar este tópico como um ponto fraco, considero que todos os atendimentos iniciais foram um desafio que impulsionaram a minha rápida evolução.

4.3 Oportunidades

Acesso a formações

Para o farmacêutico ser capaz de responder aos desafios do quotidiano, é preciso estar em constante atualização. Neste contexto, é preponderante que as indústrias e entidades científicas organizem formações. Ao longo do meu estágio tive a oportunidade de participar em diversas formações promovidas por entidades comerciais, quer na própria farmácia (ex: Nestlé®, Easyslim®, Halibut®, Previpiq® – através de visitas de delegados comerciais, que constituem uma fonte de atualização), quer em espaços fora da farmácia (ex: Àvene® solares, Klorane®, Elancyl® – Hotel Mira Corgo, Vila real; Curso geral da Bioderma® - Hotel Porto Palácio, Porto). Considero que estas formações são uma oportunidade de conhecer gamas completas de produtos e novos lançamentos no mercado, bem como uma

oportunidade de recordar matérias lecionadas ao longo dos cinco anos de formação académica.

Grande afluência da população

A localização central da FA, como anteriormente referido, permite um grande afluxo de utentes, principalmente às quintas-feiras de manhã que é quando se realiza a feira da cidade de Lamego. Para além disso, a competência e simpatia de toda a equipa são fatores que originam uma rápida fidelização por parte dos utentes. Esta grande afluência à farmácia constituiu para mim, enquanto estagiária, uma oportunidade de contactar com diversas situações clínicas e diferentes realidades socioculturais e socioeconómicas, contribuindo para uma aprendizagem mais enriquecida.

Proximidade ao utente

Este estágio curricular permitiu complementar conhecimentos em diversas áreas, e ofereceu-me ferramentas para construir uma atitude deontológica e eticamente correta. Estes pilares foram fundamentais para conseguir adquirir a empatia e confiança dos utentes, sendo que a proximidade gradual que fui criando com os mesmos fomentou a minha função de farmacêutica enquanto agente de saúde pública.

4.4 Ameaças

Medicamentos esgotados ou rateados – uma problemática

O setor farmacêutico sofre constantes alterações e a realidade económica que existe em Portugal faz com que as companhias farmacêuticas racionalizem o abastecimento de medicamentos para o nosso mercado. Durante o estágio, foram quase diárias as situações em que a resposta da farmácia às necessidades dos utentes foi posta em causa devido ao pedido de medicamentos esgotados (ex: a Aspirina GR® 100mg, usada por uma grande cota da população, esteve imenso tempo esgotada na fase inicial do meu estágio) ou rateados (ex: Daivobet®). Esta realidade de falhas no mercado farmacêutico põe em causa a credibilidade das farmácias e dificulta o acesso dos utentes à medicação, o que representa uma ameaça à saúde pública e à qualidade de vida dos utentes.

Competitividade do mercado

A farmácia comunitária lida diariamente com a concorrência, desde outras farmácias e locais de venda de MNSRM, até à existência de espaços de saúde em superfícies comerciais (ex: Well's). A preocupação *major* quanto a estes espaços de saúde é que haja pouco ou nenhum aconselhamento e/ou acompanhamento farmacêutico.

Uma simples dispensa de um xarope com açúcar para a tosse pode trazer consequências se por acaso o utente tiver diabetes e não forem feitas questões acerca da existência da patologia aquando da dispensa e aconselhamento. Isto constitui uma preocupação quer a nível da saúde pública, que pode ser negligenciada, quer a nível económico, devido à incapacidade das farmácias competirem com estes espaços a nível de preços.

Utentes de idade avançada

Uma das ameaças que identifico é que a maioria da população que recorre à farmácia já tem idade avançada, o que pode facilmente conduzir a uma perda de utentes e, conseqüentemente, perda de rentabilidade. Para além disso este grupo etário é, de fora geral, polimedicado, sendo que este facto pode ser um obstáculo em horas de maior afluxo de clientes, pois é necessário dispendir mais tempo do que o normal nestes atendimentos, devido à confusão em relação à medicação habitual e respetivos esquemas terapêuticos.

Surge, portanto, a necessidade de conquistar novos clientes, recorrendo, por exemplo, a meios de divulgação da farmácia (ex: redes sociais).

5 | Considerações Finais

O farmacêutico comunitário desempenha funções extremamente importantes no quotidiano da sociedade. Estas funções são cautelosamente exercidas de forma discreta, mas sempre com grande eficácia, profissionalismo e relevância inegável. A sua aptidão para prestar aconselhamentos e sensibilizar os utentes para o uso racional da medicação são exemplos que evidenciam o valor do farmacêutico comunitário e o conotam como um profissional de saúde essencial a nível da saúde pública. As novidades e mudanças do setor farmacêutico fazem com que haja necessidade de investir na formação contínua desta classe de profissionais de saúde, para que haja uma adaptação diária e gradual às necessidades dos utentes, sendo que a premissa geral é a integração em redes multidisciplinares de cuidados de saúde centrados no utente.

Após a análise *SWOT* do estágio curricular, considero que a Farmácia Avenida é, sem dúvida, um local onde os utentes podem recorrer para esclarecer dúvidas e/ou otimizar os seus cuidados de saúde. Tive o privilégio de ser orientada por uma equipa de profissionais de excelência, o que contribuiu para o meu crescimento quer a nível profissional como a nível pessoal. Posto isto, resta-me referir que a apreciação global do estágio curricular é extremamente positiva. Foi sem dúvida um complemento didático e enriquecedor à minha formação académica, e cada situação singular foi uma experiência compensatória.

6 | Bibliografia

- [1] ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. [Acedido a 25 maio de 2019]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf
- [2] DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE - Norma 026/2011: Abordagem Terapêutica da Hipertensão Arterial. Lisboa.
- [3] PORTAL DA ADMINISTRAÇÃO - *Kaizen*: A filosofia da melhoria contínua. [Acedido a 30 de maio de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.portal-administracao.com/2014/10/kaizen-filosofia-melhoria-continua.html>
- [4] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Portaria 137-A/2012, de 11 de maio. Lisboa: Diário da República. 1.ª Série A, p. 2478-(4). [Acedido a 5 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/dir/pdf1sdip/2012/05/09201/0000200007.pdf>
- [5] INFARMED, I.P. - Normas relativas à prescrição de medicamentos e produtos de saúde. Lisboa: Parque de Saúde de Lisboa, 2019 [Acedido a 7 de julho de 2019]. Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872
- [6] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Despacho n.º 2935-B/2016, de 25 de fevereiro. Lisboa: Diário da República. 1º Suplemento, Série 2, p. 6702-(2). [Acedido a 8 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/conteudo/73723295>
- [7] SERVIÇO NACIONAL DE SAÚDE - Programa de Troca de Seringas. [Acedido a 10 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <https://www.sns.gov.pt/noticias/2016/09/02/programa-de-troca-de-seringas/>
- [8] VALORMED - Quem somos. [Acedido a 13 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
- [9] VALORMED - Cidadão e comunidade. [Acedido a 13 de julho de 2019]. Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/12/spancidadaospan-e-comunidade>
- [10] ORDEM DOS FARMACÊUTICOS - Boas Práticas Farmacêuticas para Farmácia Comunitária. Conselho Nacional da Qualidade. 3ª Edição. 2009. [Acedido a 21 de junho de 2019]. Disponível na Internet: https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/boas_praticas_farmaceuticas_para_a_farmacia_comunitaria_2009_20853220715ab14785a01e8.pdf

[11] MINISTÉRIO DA SAÚDE - Decreto-Lei nº 95/2004, de 22 de abril. Lisboa: Diário da República. 1ª Série, p. 2439-2441.

7 | Anexos

Anexo I. Cronograma das tarefas desempenhadas.

Tarefas desempenhadas	Semanas de estágio																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Receção de encomendas																		
Conferência de encomendas																		
Armazenamento de produtos																		
Prestação de serviços																		
Controlo de prazos de validade																		
Prestação de aconselhamentos																		
Organização de receituário																		
Conferência de receitas																		
Auxílio na preparação de documentos para faturação																		
Avaliação crítica das prescrições médicas																		
Dispensa ao público-observacional																		
Dispensa ao público																		

Anexo 2. Classificação dos diferentes níveis de Pressão Arterial (Segundo a Norma 026/2011: Abordagem Terapêutica da Hipertensão Arterial).

Classificação	Sistólica (mmHg)	Diastólica (mmHg)
Ótima	<120	<80
Normal	120-129	80-84
Normal Alta	130-139	85-89
Hipertensão grau 1	140-159	90-99
Hipertensão grau 2	160-179	100-109
Hipertensão grau 3	≥180	≥110


Anexo 3. Os 9 pontos da filosofia Kaizen.





Anexo 4. Códigos do *Sifarma2000*[®] correspondentes a alguns organismos de participação que surgiram durante o estágio.

CÓDIGO	ORGANISMO DE PARTICIPAÇÃO
01	SNS - Regime Geral
41	SNS - Doenças Profissionais
45	SNS - Diplomas
47	SNS - Manipulados – Regime Geral, Pensionistas, Trabalhadores Migrantes
48	SNS - Pensionistas
67	SNS - Lupus/Hemofilia/Hemoglobinopatia
DS	SNS - Diabetes
AA	Savida – Medicina Apoiada, S.A. – SNS
AC	Sãvida – Medicina Apoiada, S.A – SNS – Pensionistas
M9	S. Bancários Centro – Sócios – SNS
77	Seguradoras Unidas
13	Caixa Geral de Depósitos (não SNS)
RI	Caixa Geral de Depósitos (CGD – SNS)

Anexo 5. Modelo da receita médica materializada da prescrição por via eletrónica e guia de tratamento.

Receita Médica Nº		Guia de tratamento para o utente	
 (representação em código de barras e caracteres)		Receita Médica Nº: (representação em código de barras e caracteres)	
Utente: (N.º do utente em código de barras e caracteres) Telefone: R.C.: Entidade Responsável: N.º de Beneficiário: (representação em código de barras e caracteres)	TIPO RECEITA	Local de Prescrição: Médico prescriptor: Telefone: Utente:	
(N.º da cédula profissional, em código de barras e caracteres ou vinhetas de prescriptor)		Código Acesso: Código Direto opção: <small>(informação a utilizar para dispensa de medicamentos na farmácia)</small>	
(Nome profissional) Especialidade: Telefone:		DCI / nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia Nº	
(Local de Prescrição) (representação em código de barras e caracteres)		1	
R. DCI / nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia N.º Extenso Identificação Ótica		2	
1		3	
2		4	
3		Encargo para o utente de acordo com os medicamentos comercializados que cumprem a prescrição médica	
4		1 (*) 2 (*) 3 (*) 4 (*)	
Validade: 30 dias Data: aa-aa-mm-dd		Para obter mais informações sobre a preço dos medicamentos: • Consulte «Pesquisa Medicamentos», no sítio do INFARMED (www.infarmed.pt); • Contacte a Linha do Medicamento 800 222 444 (Dias úteis: 09.00-13.00 e 14.00-17.00); • Fale com o seu médico ou farmacêutico. Data: aa-aa-mm-dd	
(assinatura do Médico prescriptor)		Processado por computador - software, versão - empresa	

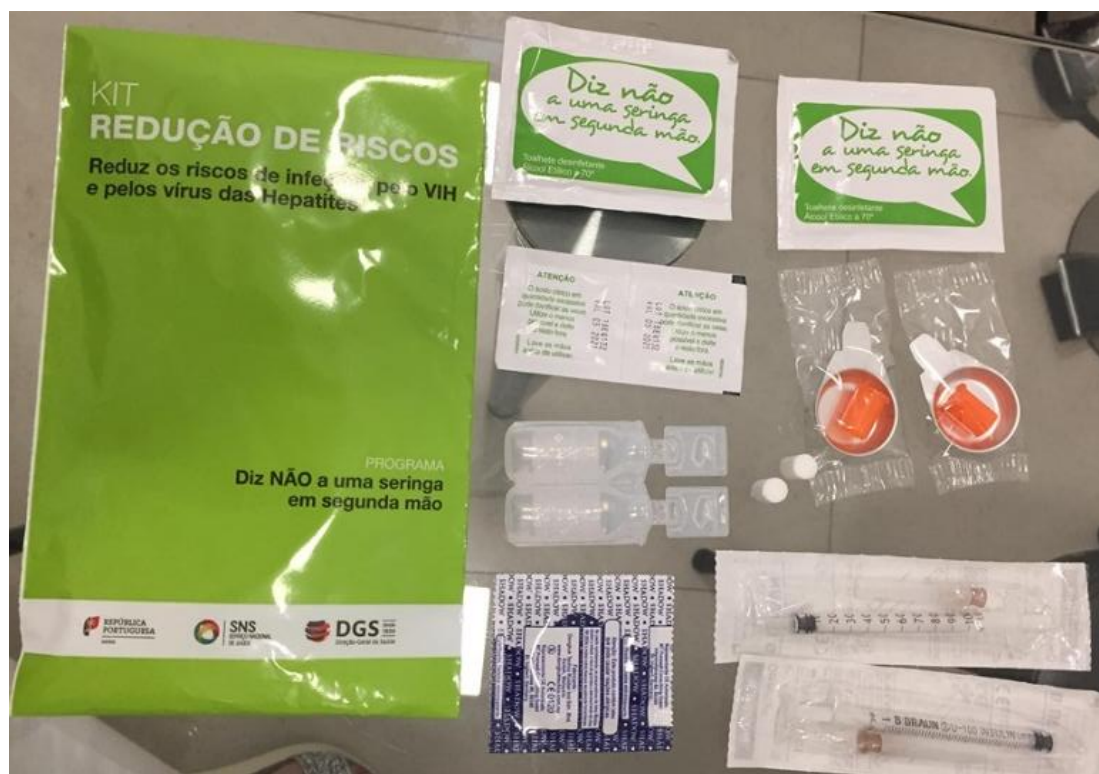
Anexo 6. Modelo do guia de tratamento de uma receita médica eletrónica desmaterializada.

	 Guia de tratamento da prescrição nº: *134589466636494994*																	
Guia de Tratamento para o Utente Não deixe este documento na Farmácia		Data: 2017-09-08																
Utente:	Local de Prescrição:																	
Código de Acesso e Dispensa: *000000*	Código de Opção: *0000*	Prescriptor:																
		Telefone:																
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">DCI / Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia</th> <th style="width: 15%;">Quant.</th> <th style="width: 15%;">Validade da prescrição</th> <th style="width: 10%;">Encargos*</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>3</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			DCI / Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia	Quant.	Validade da prescrição	Encargos*	1				2				3			
DCI / Nome, dosagem, forma farmacéutica, embalagem, posologia	Quant.	Validade da prescrição	Encargos*															
1																		
2																		
3																		

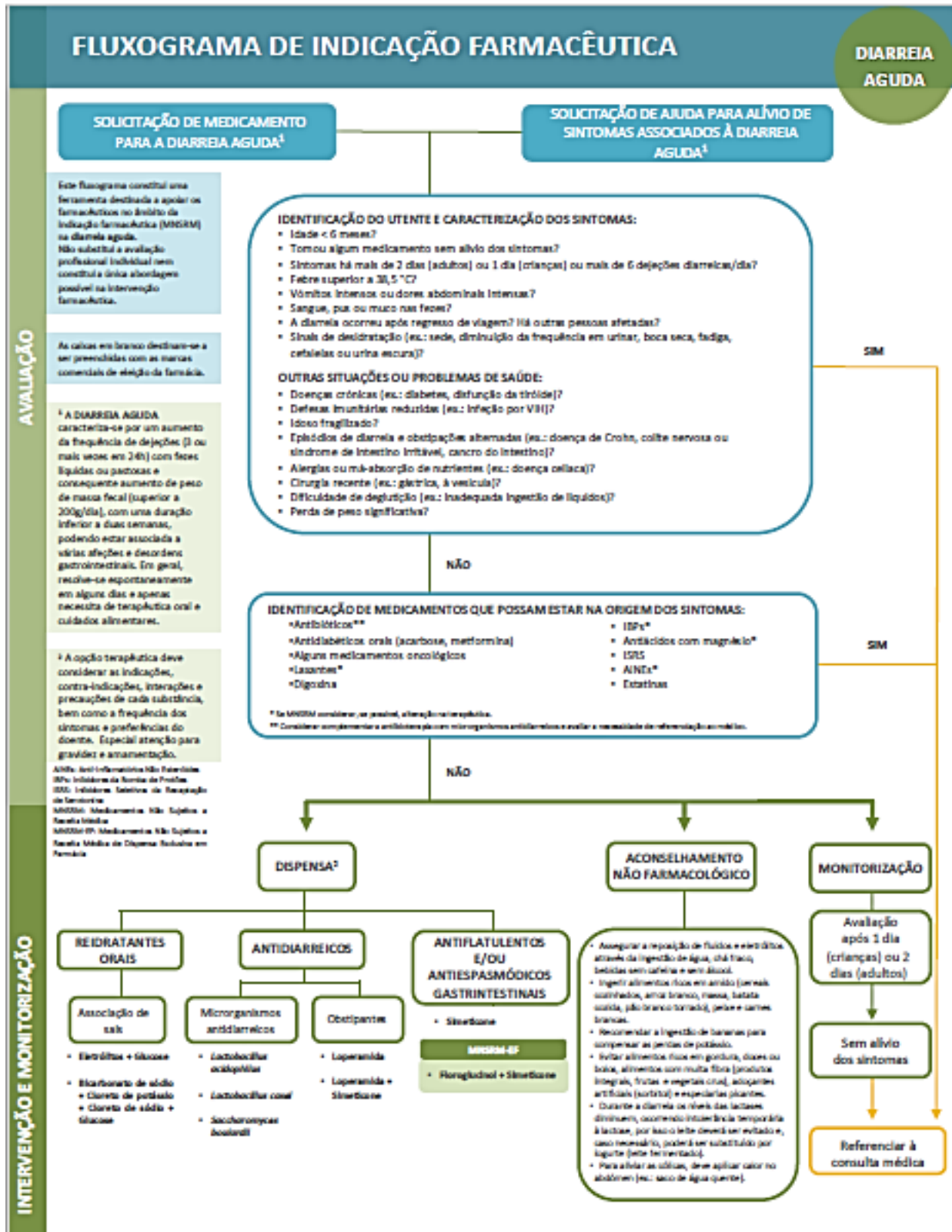
Anexo 7. Itens a verificar na validação das prescrições por via eletrónica ou por via manual.

Validação da prescrição por via eletrónica	Validação da prescrição por via manual
<p>1 — A receita, resultante da materialização da prescrição por via eletrónica, só é válida se incluir os seguintes elementos:</p> <ul style="list-style-type: none">a) Número da receita;b) Local de prescrição;c) Identificação do médico prescriptor;d) Nome e número de utente ou de beneficiário de subsistema;e) Entidade financeira responsável;f) Se aplicável, referência ao regime especial de participação de medicamentos, nos termos previstos no artigo 6.º;g) Denominação comum internacional da substância ativa;h) Dosagem, forma farmacêutica, dimensão da embalagem, número de embalagens;i) Se aplicável, designação comercial do medicamento;j) Se e consoante aplicável a informação nos termos previstos no n.º 4 do artigo 6.º ou n.º 4 do artigo 7.º;k) Se aplicável, identificação do despacho que estabelece o regime especial de participação de medicamentos;l) Data de prescrição;m) Assinatura do prescriptor. <p>2 — A receita é válida pelo prazo de 30 dias a contar da data da sua emissão, sem prejuízo do disposto no número seguinte.</p> <p>3 — A receita pode ser renovável, contendo até três vias, com o prazo de validade de seis meses para cada via, contado desde a data de prescrição, com a indicação «1.ª via», «2.ª via» e ou «3.ª via».</p>	<p>1 — A receita manual só é válida se incluir os seguintes elementos:</p> <ul style="list-style-type: none">a) Se aplicável, vinheta identificativa do local de prescrição;b) Vinheta identificativa do médico prescriptor;c) Identificação da especialidade médica, se aplicável, e contacto telefónico do prescriptor;d) Identificação da exceção nos termos do n.º 2 do artigo 8.º;e) Nome e número de utente e, sempre que aplicável, de beneficiário de subsistema;f) Entidade financeira responsável;g) Se aplicável, referência ao regime especial de participação de medicamentos, nos termos previstos no artigo 6.º;h) Denominação comum internacional da substância ativa;i) Dosagem, forma farmacêutica, dimensão da embalagem, número de embalagens;j) Se aplicável, designação comercial do medicamento;k) Se e consoante aplicável a informação nos termos previstos no n.º 4 do artigo 6.º ou n.º 4 do artigo 7.º;l) Se aplicável, identificação do despacho que estabelece o regime especial de participação de medicamentos;m) Data de prescrição;n) Assinatura do prescriptor. <p>2 — Não é admitida mais do que uma via da receita manual.</p>

Anexo 8. Kit “Redução dos riscos” do Programa de Troca de Seringas.



Anexo 9. Exemplo de um fluxograma de indicação farmacêutica: diarreia aguda.



AVALIAÇÃO

Este fluxograma constitui uma ferramenta destinada a apoiar os farmacêuticos no âmbito da indicação farmacêutica (MDRM) na diarreia aguda. Não substitui a avaliação profissional individual nem constitui a única abordagem possível na intervenção farmacêutica.

As caixas em branco destinam-se a ser preenchidas com as marcas comerciais de eleição da farmácia.

¹ A DIARREIA AGUDA caracteriza-se por um aumento da frequência de defeções (3 ou mais vezes em 24h) com fezes líquidas ou pastosas e consequente aumento de peso de massa fecal (superior a 200g/dia), com uma duração inferior a duas semanas, podendo estar associada a várias afecções e distúrbios gastrointestinais. Em geral, resolve-se espontaneamente em alguns dias e apenas necessita de terapêutica oral e cuidados alimentares.

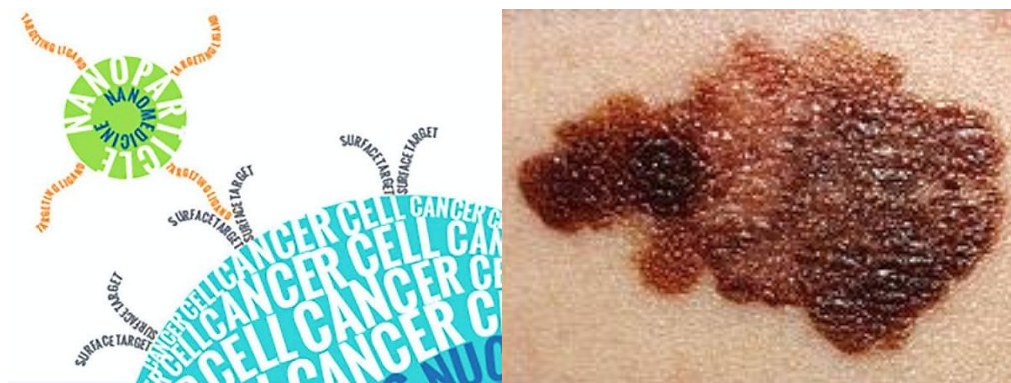
² A opção terapêutica deve considerar as indicações, contra-indicações, interações e precauções de cada substância, bem como a frequência dos sintomas e preferências do doente. Especial atenção para gravidez e amamentação.

ANEs: Anti-Neoplásicos Não Esteróides
IDPs: Inibidores da Bomba de Prótons
ISRS: Inibidores Seletivos de Recaptação de Serotonina
MDRM: Medicamentos Não Sujetos a Avaliação Pré-clínica
MDRM (P): Medicamentos Não Sujetos a Avaliação Pré-clínica Realizada em Farmácia

INTERVENÇÃO E MONITORIZAÇÃO

PARTE III

MONOGRAFIA INTITULADA "UNRAVELING THE POTENTIAL OF NANOTECHNOLOGY TOWARDS CUTANEOUS MELANOMA THERAPY – AN UPDATE REVIEW"



Carina Alexandra Teixeira Monteiro

Orientadora: Professora Doutora Ana Cláudia Santos

Abstract

Cutaneous melanoma (CM) is the most alarming form of skin cancer, being an aggressive and multidrug-resistant tumor. Over the last decades, the incidence rate of CM has increased in Caucasians. The multidrug resistance and the toxicity attributed to conventional systemic chemotherapeutic agents remain the major challenges in CM treatment. The surgical excision continues to be the first-line therapeutic option, nevertheless fresh innovative technological strategies, such as nanotechnology are being explored in order to offer therapeutic alternatives aiming the reduction of CM morbidity and mortality.

Scientists are expecting medical advances with the application of nanosystems in CM diagnosis and treatment. Nanotechnology represents a paradigm shift with the potential to improve drug delivery, minimize drug toxicity and mitigate drug resistance. Several studies have demonstrated that a diverse array of nanosystems can be used to circumvent the current limitations of CM available treatments. Under these circumstances, there is an urgent need to reformulate drugs of interest using nanotechnology as an alternative promising approach.

The first part of this review provides a summary of CM pathophysiology and available therapies. The second part presents a comprehensive review of the different nanotherapeutic approaches hitherto investigated against CM.

Keywords: Cutaneous melanoma; Drug delivery system; Nanotechnology; Nanosystem; Nanoparticle; *In vitro*; *In vivo*.

Resumo

O melanoma cutâneo é a forma mais alarmante de cancro de pele, sendo um tumor agressivo e amplamente resistente aos tratamentos. Nas últimas décadas, a sua incidência aumentou nas populações Caucasianas. A resistência e a toxicidade atribuídas aos fármacos quimioterapêuticos convencionais continuam a ser os principais desafios no tratamento do melanoma cutâneo. A excisão cirúrgica continua a ser a opção terapêutica de primeira linha, contudo novas estratégias tecnológicas inovadoras, como a nanotecnologia, têm sido estudadas no sentido de oferecer alternativas terapêuticas cujo objetivo é reduzir a morbidade e a mortalidade do melanoma cutâneo.

Os cientistas esperam avanços médicos com a aplicação de nanosistemas no diagnóstico e tratamento do melanoma cutâneo. A nanotecnologia representa uma mudança de paradigma, com o potencial de melhorar a administração de fármacos, minimizar a sua toxicidade e atenuar a resistência aos tratamentos. Diversos estudos demonstraram que uma gama diversificada de nanosistemas pode ser utilizada para contornar as limitações atuais das terapias disponíveis para o melanoma cutâneo. Nestas circunstâncias, há uma necessidade urgente de reformular fármacos de interesse usando a nanotecnologia como uma abordagem alternativa promissora.

A primeira parte desta revisão contempla um resumo da fisiopatologia do melanoma cutâneo e das terapias disponíveis. A segunda parte apresenta uma revisão abrangente das diferentes abordagens nanoterapêuticas até agora investigadas para o tratamento do melanoma cutâneo.

Palavras-chave: Melanoma cutâneo; Sistema de administração de fármacos; Nanotecnologia; Nanosistema; Nanopartícula; *In vitro*; *In vivo*.

List of abbreviations

5-FU - 5-fluorouracil

α - MSH - α -Melanocyte Stimulating Hormone

AIDS - Acquired Immune Deficiency Syndrome

AuNP - Gold Nanoparticle

BBB - Blood Brain Barrier

BCC - Basal Cell Carcinoma

BRAF - v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1, Serine/Threonine Kinase

CAP - Cold Atmospheric Plasma

CDKN2A - Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2A gene

CDK4 - Cyclin-Dependent Kinase 4 gene

CM - Cutaneous Melanoma

c-MET - Hepatocyte Growth Factor Receptor

CNT - Carbon Nanotube

CONP - Cuprous Oxide Nanoparticle

COX-2 - Cyclooxygenase-2

CSC - Cancer Stem Cell

DL - Drug Loading

DLS - Dynamic Light Scattering

DNMT - DNA methyltransferase

DTX - Docetaxel

EE - Encapsulation Efficiency

EHS - Engelbreth-Holm-Swarm

EMT - Epithelial-Mesenchymal Transition

FDA - *Food and Drug Administration*

GRGDG - *Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-NH₂ pentapeptide*

HGF - Hepatocyte Growth Factor

IC₅₀ - Half Inhibitory Concentration

IFN- α - Interferon-alpha

IL-2 - Interleukin-2

IR - Inhibition Ratio

LMM - Lentigo Maligna Melanoma

MAPK - Mitogen Activated Protein Kinase

MC1R - Melanocortin I Receptor Gene

MDR - Multidrug Resistance
MEK - Mitogen-Activated Protein Kinase
MIA - Melanoma-Inhibitory Activity protein
miR-34a - MicroRNA 34a
MMP - Metalloproteinase
MPT - Multiphoton Tomography
NLC - Nanostructured Lipid Carrier
NMM - Nodular Melanoma
NMSC - Nonmelanocytic Skin Cancer
NOD/SCID - Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
NP - Nanoparticle
NRAS - Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog, GTPase
NSAIDS - Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs
P20 - Peptide P20
PDI - Polydispersity Index
PD-L1 - Programmed Death-Ligand 1
PDT - *Photodynamic Therapy*
PEG – *Poly (ethylene glycol)*
PEI - Poly (ethyleimine)
PI3K - Phosphoinositide 3-Kinase
PIP2 - Phosphatidylinositol-Diphosphate
PIP3 - Phosphatidylinositol-Triphosphate
PLA - Poly (lactic acid)
PLGA - Poly (lactide-co-glycolide acid)
PS - Photosensitizing Agent
PTEN - Phosphatase and Tensin Homolog
QDII - Quantitative Dynamic Infrared Imaging
RCM - Reflectance Confocal Microscopy
RES - Reticuloendothelial System
RGP - Radial Growth Phase
RNS - Reactive Nitrogen Species
ROS - Reactive Oxygen Species
SCC - Squamous Cell Carcinoma
SDD - Sequential Digital Dermoscopy
siRNA - Small Interfering RNA

SLN - Solid Lipid Nanoparticle
SSM - Superficial Spreading Melanoma
STAT3 - Signal Transducer and Activator of Transcription 3
SWCNT - Single-Walled Carbon Nanotube
TBP - Total Body Photography
TD - Transdermal
TLR7/8 - Toll-Like Receptor 7 and 8
TNF- α - *Tumor Necrosis Factor- α*
UV - Ultraviolet
VGP - Vertical Growth Phase
XRD - X - Ray Diffraction
ZnPc - Zinc Phthalocyanine
ZP - Zeta Potential

Figure index

Figure 1. The five stages representing the progress of cutaneous melanoma (CM) pathogenesis.

Figure 2. Schematic representation of the complex interaction of risk factors of cutaneous melanoma (CM).

Figure 3. Available therapies for cutaneous melanoma (CM) divided into different approaches.

Figure 4. Classification of nanosystems used for cutaneous melanoma (CM) therapy, according to their organic or inorganic natures.

Figure 5. Nanosystems physicochemical properties that affect their therapeutic performance.

Figure 6. Types of nanotherapeutic approaches for cutaneous melanoma (CM) treatment.

Table index

Table I. Non-invasive tools in dermatology which are usually applied for CM detection, divided in category-I, II, III and IV devices.

I | Introduction

The skin is the largest organ of the body and evidences three main functions: protection, regulation and sensation. It consists of two main layers that work as a single structure: epidermis (the superficial layer) and dermis (anchors skin appendages and contains blood vessels and abundant immune cells). Beneath the dermis lies the hypodermis or subcutaneous fatty tissue (SIMOES *et al.*, 2015).

Skin cancers are one of the most common malignancies in Caucasians and their incidence increases significantly with age. They are classified according to their precursor cell and the clinical behavior. Generally, skin cancers are subdivided into nonmelanocytic skin cancers (NMSCs) and cutaneous melanoma (CM). Subsequently, the NMSCs can be divided in two types: squamous cell carcinomas (SCCs) and basal cell carcinomas (BCCs) (NAVES *et al.*, 2017). NMSCs show a higher incidence than CM, but they have a better prognosis and are easier to treat. The incidence of NMSCs is higher in Caucasians and mortality rates are much higher in women and men from southern European countries (e.g., Spain, Portugal) compared to Nordic countries. BCCs are the most common form of NMSCs (80% of NMSCs) and rarely metastasizes, thus, despite causing significant morbidity, the mortality rates of BCCs are low. SCCs (20% of NMSCs) are more likely to cause death than BCCs due to the higher capacity to invade other tissues (SIMOES *et al.*, 2015). The most problematic, treatment-refractory and deadliest form of skin cancer is CM, since it quickly invades adjacent healthy tissues and metastasizes (SIMOES *et al.*, 2015).

CM arises from the uncontrolled growth of melanin-producing cells (melanocytes) and it is notorious for its challenging multidrug resistance mechanisms (MISHRA *et al.*, 2018). Melanocytes are cells that produce the skin-darkening pigment, melanin, which is a macromolecule that absorbs UV (ultraviolet) radiation which, in turn, stimulates its production. There are about 3 billion cutaneous melanocytes in the skin, mostly localized at the basis of the epidermis. Melanocytes are not exclusive skin cells, being also present in the hair follicles, in the uveal tract of the eye and in other tissues, thus, besides being less common, the occurrence of melanoma is not confined to the skin (SHAIN and BASTIAN, 2016). The major subtypes of CM are superficial spreading melanoma (SSM), nodular melanoma (NMM) and lentigo maligna melanoma (LMM). The most common subtype of CM is SSM, accounting for about 70% of cases. NMM represents 5% of cases and usually occurs in the 60th decade of life. LMM a type of *in situ* melanoma, accounts for 5% to 15% of CM cases, and it is correlated with increasing age and long-term UV exposure (RASTRELLI *et al.*, 2014). CM shows a particular physiopathology, being characterized by five stages: nevus, dysplastic nevus, melanoma *in situ*, invasive melanoma and metastatic melanoma (Figure 1)

(SHAIN and BASTIAN, 2016).

CM exhibits a complex epidemiology and the incidence varies according to age, sex, ethnicity and geography. CM affects women and man distinctively, but the epidemiological studies are not always coincident, because, according to some of them, it is necessary to simultaneously correlate incidence with sex and age (BERWICK *et al.*, 2016). There are variations in incidence rates across different ethnic groups. CM has become one of the commonest cancers in Caucasians (fair-skinned) and this variation can be attributed to lower photoprotection due to the fact that they have less melanin. The melanin barrier reduces the effects of ultraviolet A (UVA, of long wavelength) and ultraviolet B (UVB, of average wavelength) radiations, providing protection against UV-induced skin cancers (AUTIER and DORE, 2019). CM incidence also varies by geographic location. As a matter of fact, differences in geography changes several factors, namely the atmospheric absorption, altitude, latitude and cloud cover, which influence the amount of UV radiation that penetrates the skin (KILIC *et al.*, 2017). Summarizing, data on CM has shown that the incidence of this skin cancer has steadily increased over the last decades. The rising incidence may be due to earlier detection and diagnosis of melanomas as well as the enhanced public education. Owing to such, it is crucial to find effective alternative therapies in order to alter the growing trend of the CM incidence rate (RASTRELLI *et al.*, 2014). There are several risk factors solidly correlated with CM incidence, such as UV exposure, skin type, hair and eye pigmentation, acquired melanocytic nevi, geographic location and iatrogenic exposures. In addition, the epidemiologic data indicates that genetic factors and gender may influence the histopathologic characteristics of the CM lesions and their body surface distribution (NIKOLAOU and STRATIGOS, 2014).

The diagnosis is usually made by simple visual examination of the skin but several non-invasive diagnostic strategies that use assisted optical devices exist, and those are classified into different categories (FINK and HAENSSLE, 2017). Currently, several treatments are available for CM, including surgery, radiotherapy, systemic chemotherapy, topical chemotherapy, immunotherapy, and the recent targeted therapy (MISHRA *et al.*, 2018). However, the available therapies still present some challenges that need to be surpassed, such as their low response rate, which may be due to the intrinsic resistance of melanoma cells and the resistance gained after treatment, which is one of the greatest problems related to cancers nowadays. The available CM therapies are mainly systemic and their effectiveness is reduced due to the tortuous and fenestrated vasculature of these solid tumors. The heterogeneity of CM also offers a limitation in the design of current therapies, once melanoma cells exhibit a multipotent phenotype (expressing, e.g., embryonic and

cancer stem cell capabilities) that contributes for CM functional adaptation and makes these cancer cells resistant to therapy. Chemotherapy, e.g., fails to treat CM due to melanoma cells resistance and induces instead the apoptosis of healthy cells, resulting in toxic side effects that lead to poor therapeutic outcomes (SHANNAN *et al.*, 2016).

Facing the aforementioned problems, the design of new therapeutic strategies to treat or mitigate this chronic skin condition is imposed. Nanotechnology has been showing promising potential applications in the field of biomedicine, with particular emphasis on drug delivery systems development. Several nanosystems have been explored to be applied in CM treatment, either as drug carriers (including nanoemulsions, liposomes, lipid nanoparticles (NPs), among others) or as anti-melanoma agents *per se* (due to their physicochemical properties; as, e.g., gold nanoparticles (AuNPs) for phototherapy purposes), as it is going to be exposed further in this review (VINES *et al.*, 2019). To overcome the disadvantages of the conventional systemic drug administration, namely the toxic off-target effects and short circulation time, researchers have focused their efforts in the design of smart nanotechnology-based drug delivery systems. The significant advances in nanotechnology-based drug delivery systems, or nanosystems, have led to the development of effective treatments by researchers (WANG *et al.*, 2017). The encapsulation of drugs in nanosystems presents several advantages, as: longer circulation time, higher stability, higher bioavailability, controlled drug release and reduction of the total dose required, minimizing the toxic off-target side effects (RIGON *et al.*, 2015).

The aim of this review is to briefly discuss, in a first section, the CM physiopathology, risk factors, the oncogenic pathways and biomarkers, and the available diagnosis and treatment options. Afterwards, in a second section, a comprehensive review regarding the potential of nanotechnology-based drug delivery systems in CM treatment is presented, reinforcing the future perspectives and challenges of cancer nanomedicine.

2 | Cutaneous melanoma

2.1. Physiopathology

CM is a skin cancer derived from melanocytes. CM development is a multistep process and the pathogenesis can be divided into five stages (Figure 1) (LEONARDI *et al.*, 2018).

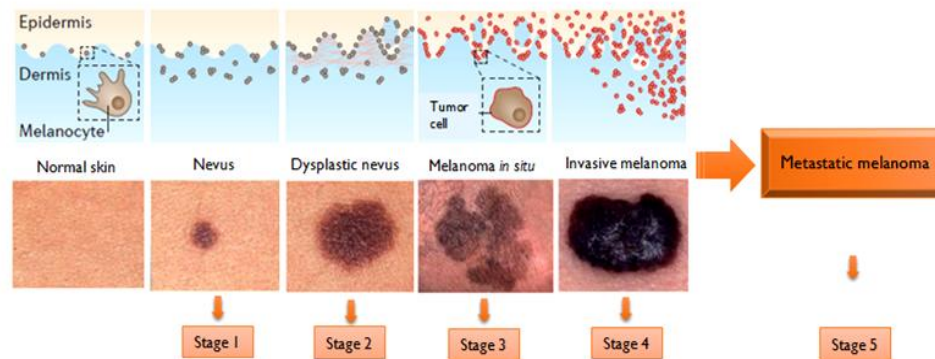


Figure 1. The five stages representing the progress of cutaneous melanoma (CM) pathogenesis.

In stage one, as a result of increased melanocyte proliferation, the acquired nevus, a benign skin lesion, begins to form (WANG *et al.*, 2017). Caucasian individuals usually have 25 nevi on average that measure, in diameter, at least 2 mm. Although nevi are unlikely to progress to CM, their high prevalence increases the possibility of progression (SHAIN and BASTIAN, 2016).

In the second stage, melanocytes grow into a dysplastic nevus, *i.e.*, an intermediate neoplasm (WANG *et al.*, 2017). Similar to melanoma, dysplastic nevus appear to result from the complex interaction of environmental, genetic and host factors, showing abnormal proliferation and differentiation. A dysplastic nevus can exhibit a mixture of colors, from pink to dark brown and usually appears in areas more exposed to the sun and UV radiation. Usually, it is flat, slightly scaly and it has an irregular edge (SHAIN and BASTIAN, 2016).

In the third stage, the dysplastic nevus keep growing into the radial growth phase (RGP) primary tumor, resulting in melanoma *in situ* formation (WANG *et al.*, 2017). Melanoma *in situ* refers to a proliferation of melanocytes that do not have the capability to invade the dermis but can grow entirely within the epidermis in an irregular pattern. This stage can persist for many years leading to the accumulation of additional genetic modifications (*i.e.*, mainly mutations) in the cancer cells that will increase their invasive potential (SHAIN and BASTIAN, 2016).

The stage four is the vertical growth phase (VGP). An invasive potential is acquired through genetic and epigenetic modifications and the cells become able to leave the

epidermis and enter the subjacent mesenchymal tissue (dermis). In this stage, melanomas have the potential of being self-sufficient growth signals, thus making the treatment more restricted (WANG *et al.*, 2017).

In the last stage, melanoma becomes metastatic. VGP melanomas begin to invade surrounding healthy tissues and continue to grow larger (WANG *et al.*, 2017). Melanoma metastases (similar to other solid tumours) usually appear initially in the lymph nodes of the draining area of the primary tumor, whereas distant metastases, mainly in the lung, only tend to appear later (SHAIN and BASTIAN, 2016).

2.2 Risk factors

CM is considered a multi-factorial skin cancer that arises from a complex interaction between UV radiation exposure, phenotypic factors, genetic susceptibility, and additional risk factors, as depicted in Figure 2. This interaction among the different risk factors influences the oncogenic pathways through which the tumor develops, as well as the clinical characteristics of melanoma. It is important to be aware of the causative factors to better manage the prevention of this type of skin cancer (SIMOES *et al.*, 2015).

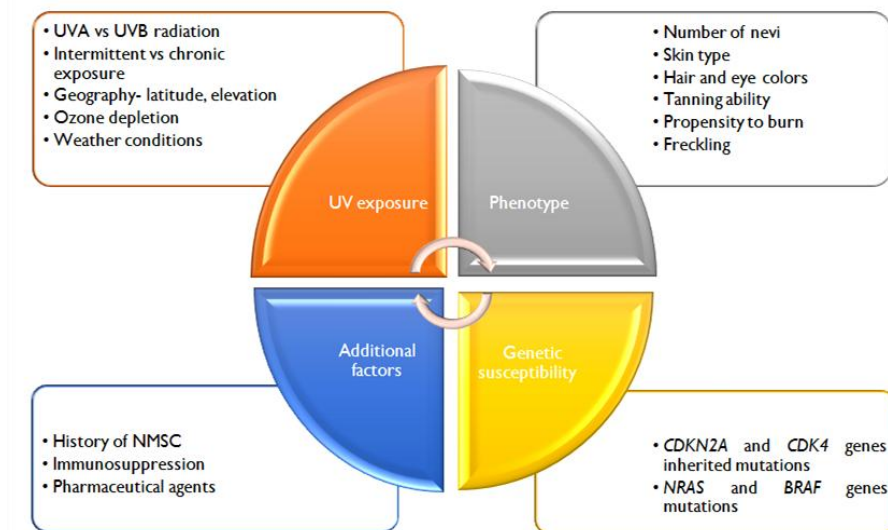


Figure 2. Schematic representation of the complex interaction of risk factors of cutaneous melanoma (CM).

BRAF v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, serine/threonine kinase; *CDK4* cyclin-dependent kinase 4 gene; *CDKN2A* cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene; NMSC nonmelanocytic skin cancer; *NRAS* neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, GTPase; UVA ultraviolet A; UVB ultraviolet B.

The major environmental risk factor of CM is the uncontrolled exposure to UV radiation, which has a potential genotoxic effect. UV-associated harmful effects include cell oxidative stress, gene mutations and immunosuppression. The fair skin of Caucasians is a consequence of the presence of lower levels of UV-blocking pigment (eumelanin). In this sense, Caucasians are more prone to suffer from UV radiation harmful effects because these

populations are exposed to increased doses of UV that easily reach the deeper layers of the skin, which contain melanocytes. In addition, factors such as the altitude, latitude, ozone depletion and weather conditions influence the UV radiation exposure. The exposure to UV radiation is classified as chronic (e.g. occupational exposure), intermittent (e.g. short and intense, such as sunbathing) and total sun exposure (the sum of both). There is solid evidence that an intermittent pattern of sun exposure enhances CM risk, but chronic exposure shows no association or a very weak association. This may be due to the fact that chronic exposure promotes epithelial thickening and this may offer protection against further exposure to UV radiation. Most of UVB (315–280 nm) and all UVC (280–100 nm) radiations are removed by stratospheric ozone so the UV radiation that reaches the earth is mainly UVA (400–315 nm) and UVB. It is known that UVB is a risk factor for sunburn, but both UVB and UVA might cause CM (SAMPLE and HE, 2018).

The phenotypic risk factors for CM include: the type, size and number of melanocytic nevi; skin, hair, and eye color; tanning ability; propensity to burn and freckling (NIKOLAOU and STRATIGOS, 2014). Melanocytic nevi might be congenital or acquired. Data from a recent meta-analysis indicates that individuals with more than 100 standard nevi have a 7-fold increased risk for CM than individuals with few nevi (<15). The size also increases the risk to develop CM, particularly those larger than 2.0 mm in diameter. Dysplastic or atypical nevi are also associated with a greater risk of CM. In fact, this type of nevi are typified due to their cytological abnormality and patients with only one atypical nevi are already at a 1.6 times greater risk of developing CM (DAMSKY and BOSENBERG, 2017).

The genetic susceptibility, namely family history and heritable factors increase the predisposition for CM. Some familiar cases are related to inherited mutations of the *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* and *cyclin-dependent kinase 4 (CDK4)* genes, that are two high-penetrance genes. The *CDKN2A* gene encodes two proteins, p14ARF and p16INK4A, which are involved in melanocyte senescence and tumor suppression. The *CDKN2A* gene is localized on the band 21 of the short arm of chromosome 9 (9p21) and was identified in 1994 as the first high-penetrance CM susceptibility gene. Among the low-risk genes, the most associated with melanoma is the *melanocortin-1 receptor (MC1R)* gene, a G-protein coupled receptor that binds to α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH). *MC1R* gene polymorphisms cause modifications in the melanogenesis, i.e., the photoprotective eumelanin turns into pheomelanin, resulting in a phenotypic spectrum of fairness skin, UV sensitivity, red hair color, freckles and, thus, enhanced melanoma risk (VALLONE *et al.*, 2018). Additional mutations considered as somatic genetic risk factors exist, such as mutations in the neuroblastoma RAS viral oncogene homolog, GTPase (*NRAS* proto-

oncogene) and v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, serine/threonine kinase (*BRAF* proto-oncogene). The *NRAS* gene is involved in the regulation of cell division and *BRAF* gene regulates cell growth. Mutations in the *NRAS* and *BRAF* genes are common in CM, although rarely detected simultaneously in the same tumor. *BRAF*-mutant melanomas are diagnosed at earlier ages and are associated with intermittently sun-exposed sites (e.g. the trunk), while *NRAS*-mutant melanomas are diagnosed at later ages and are not associated with a particular anatomical location (ELLERHORST *et al.*, 2011).

Additional risk factors of CM include: personal history of NMSC; immunosuppressed individuals (e.g. acquired immune deficiency syndrome (AIDS), organ transplantation or lymphoproliferative diseases). More recently, the association of some drugs (e.g., Tumor necrosis factor α (TNF- α) inhibitors and NSAIDS (nonsteroidal anti-inflammatory drugs) with melanoma has also been investigated (NIKOLAOU and STRATIGOS, 2014).

2.3. Oncogenic pathways and biomarkers

CM, similarly to other cancer types, results from the association of epigenetic and genetic modifications that cause the neoplastic transformation. As melanoma exhibits considerable resistance to most of the available systemic therapies, it is critical to deeply investigate potential molecular targets and signaling oncogenic pathways (PALUNCIC *et al.*, 2016). In the past decades, it was discovered that key oncogenic pathways are involved in melanoma onset and progression. Major signaling pathways in the physiopathology of CM include the classical mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascade involving the kinases Ras/Raf/MEK/ERK and the phosphoinositide-3-kinase (PI3K) pathway. The activation of these oncogenic pathways can occur without external stimuli, through the constitutive activation of oncogenes, or by an external stimuli that initiate the transmission of the signaling cascade to intracellular effectors. These pathways play a major role in CM progression and have been the target of recent strategies to treat this skin cancer (PALUNCIC *et al.*, 2016).

The MAPK pathway regulates acute hormone responses, cell growth, differentiation, proliferation and apoptosis. The existence of a physiological negative feedback is very important to prevent the systematic activation of this pathway (AMARAL *et al.*, 2017). The activation of this oncogenic pathway generates signals that are transmitted via the RAS GTPase, culminating in the activation of MEK1/2 kinases, subsequently activating ERK1 and ERK2, which become able to translocate to the nucleus and regulate some transcription factors. In CM pathogenesis, MAPK pathway activation occurs differently. *BRAF* gene stimulation can directly activate MEK and ERK, but in *BRAFV600* mutated cells the negative

feedback does not exist, being, thus, the MAPK pathway systematically activated, culminating in an uncontrolled cellular proliferation (AMARAL *et al.*, 2017).

PI3K and their downstream mediators (protein kinase B (AKT) and the mammalian target of rapamycin (mTOR)) are the main components of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathway, which is another oncogenic pathway critically involved in CM. PI3K belongs to a group of lipid kinases and participates in various functions, including cell growth and proliferation, metabolism, protein synthesis and also multidrug resistance (DAVIES, 2012). This pathway is activated by the stimulation of the tyrosine kinases extracellular receptor and, as a consequence, phosphatidylinositol-diphosphate (PIP₂) is phosphorylated by PI3K to phosphatidylinositol-triphosphate (PIP₃). The resultant PIP₃ functions as a binding ligand for AKT. Activated AKT inhibits, by phosphorylation, the activity of its protein targets and induces a strong anti-apoptotic effect, promoting CM development. This signaling cascade can be inhibited by phosphatase and tensin homolog (PTEN), which is a relevant regulatory enzyme that prevents over-activation of this pathway by PIP₃ dephosphorylation (DAVIES, 2012).

From the clinical point of view, CM diagnosis is difficult due to the lack of an ideal biomarker. Thereby, the identification and validation of a suitable biomarker is crucial to improve CM diagnosis and prognosis. An ideal biomarker requires specificity and sensitivity (to minimize doubtful results). It also must be a stable molecule quantifiable in blood or in other body fluid; and it should be collected by minimally invasive procedures. The existence of suitable biomarkers enables the treatment of CM before its symptomatic stage, and is mainly important to predict and follow the development of metastases (EISENSTEIN *et al.*, 2018). There are two categories of biomarkers: diagnostic and prognostic biomarkers. The first ones are those that show greater expression in tumor cells compared to normal tissues, thus, supporting the diagnosis, as the *BRAF* gene. Most of the CM cases are related to mutations in the *BRAF* gene. These changes lead to the production of abnormal BRAF protein, leading to melanocytes cells uncontrolled growth. Melanoma patients should be submitted to a biopsy to determine if there is a mutation in the *BRAF* gene. In the other hand, prognostic biomarkers are indicators of disease recurrence during follow-up, since they show higher expression in CM advanced stages. As the signs of the disease become visible, the prognostic markers assume the major relevance once the main bottlenecks of CM are recurrence and metastasis (even after tumor removal). Some prognostic biomarkers are mitotic count, extent of nodal involvement, depth of invasion, as well as serum lactate dehydrogenase (LDH) and S100 family of calcium-binding proteins (WEINSTEIN *et al.*, 2014). LDH is a cytoplasmic enzyme that catalyzes the interconversion of pyruvate to lactate (with

a concomitant interconversion of NADH to NAD⁺) and the S100 family are a group of proteins that participate in regulation of protein phosphorylation, Ca²⁺ homeostasis, inflammatory response and cell growth and differentiation (KARAGIANNIS *et al.*, 2014). Other examples of relevant biomarkers for melanoma are tyrosinase (an enzyme involved in melanin biosynthesis), cyclooxygenase-2 (COX-2) (a negative prognostic biomarker), matrix metalloproteinases (MMPs) (enzymes that contribute to tumor tissue microenvironment remodeling), the melanoma-inhibitory activity (MIA) protein secreted by melanoma cells, among many others (KARAGIANNIS *et al.*, 2014). Nevertheless, the identification and validation of CM biomarkers is still a serious challenge. Further investigations on CM biomarkers will allow early detection, therapeutic monitoring and prognostic evaluation (EISENSTEIN *et al.*, 2018).

2.4. Diagnosis

Over the last 30 years, a crucial development in the diagnosis of early CM has been achieved. The importance of detecting CM in early and still curable stages remains the key factor in reducing mortality and it is clearly related to non-metastatic effects (RASTRELLI *et al.*, 2014). The location of CM lesions in the skin constitutes an advantage as it allows early diagnosis through non-invasive tools, since it is possible to visualize by the naked eye the morphologic changes of nevi (FINK and HAENSSLE, 2017). The simplest method for screening melanoma is the visual inspection on skin self-examination. A need to educate the public to recognize early clinical signs of CM was imposed. Thus, in 1985, the ABCD criteria (asymmetry, border irregularity, color variation, diameter >6mm) was developed. The ABCD criteria is a simple diagnosis tool easily implemented in daily life. Other screening techniques were developed, such as the Glasgow's 7-point checklist, however those are less widely adopted (RIGEL *et al.*, 2010).

Additionally, several non-invasive diagnostic strategies to detect CM are available. In this regard, the assistive optical devices that are used can be classified into different categories (I - IV), as depicted in Table I (FINK and HAENSSLE, 2017). More studies are needed to understand the efficacy, disadvantages and advantages of these non-invasive techniques. Above all, it has to be emphasized that none of all the previously discussed approaches is able to provide a final and definite diagnosis, or to replace the histopathological examination of biopsies, since the excisional biopsy and histological examination of doubtful lesions remains the gold standard to diagnose CM (FINK and HAENSSLE, 2017).

Table I. Non-invasive tools in dermatology which are usually applied for CM detection, divided in category-I, II, III and IV devices. Adapted from: (FINK and HAENSSLE, 2017).

Category	Non-invasive tools in CM	Description
Category-I devices	Dermoscopy	Large-scale screening of patients in daily clinical routine
	Sequential digital dermoscopy	
	Total body photography	
Category-II devices	Computer-aided multispectral digital analysis	Assessment of few preselected atypical lesions
	Electrical impedance spectroscopy	
	Raman spectroscopy	
Category-III devices	Reflectance confocal microscopy	Assessment of preselected lesions by trained experts at specialized centres
	Multiphoton tomography	
Category-IV devices	Stepwise two-photon-laser spectroscopy	Experimental stage of development
	Quantitative dynamic infrared imaging	

2.5. Therapy

Surgical excision, radiotherapy, topical and systemic chemotherapy, immunotherapy and targeted therapy are the current available therapeutic options for CM (Figure 3), which are going to be described below. CM immunotherapy and targeted therapy are developed to focus on specific biological mechanisms and targets, however the mechanisms of action of the majority of the current available CM therapies are not fully understood (MISHRA *et al.*, 2018).

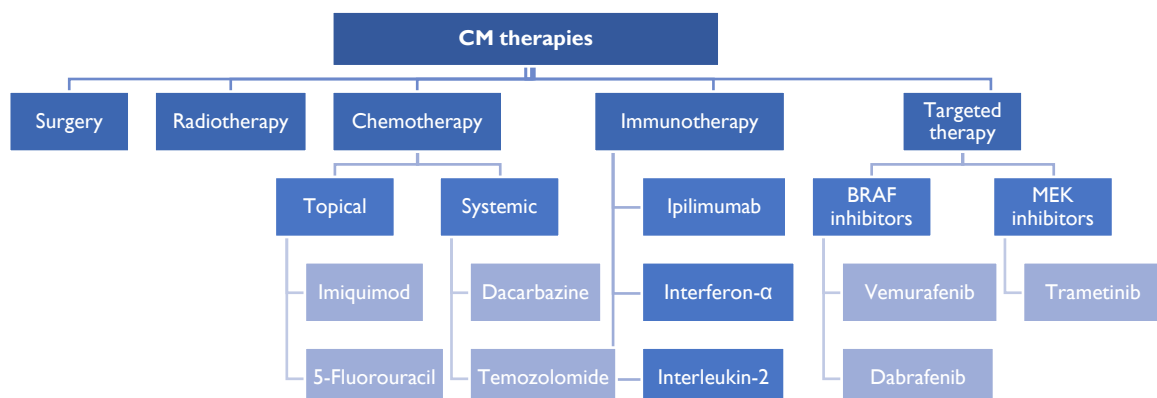


Figure 3. Available therapies for cutaneous melanoma (CM) divided into different approaches. CM cutaneous melanoma; BRAF v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog BI, serine/threonine kinase.

2.5.1. Surgery

Surgery remains the first-line therapeutic option for primary CM, and in most cases it is curative. Surgical excision *per se* can treat early-detected CM but, for advanced stages, the long-term survival is very poor (ERDEI and TORRES, 2010). Appropriate surgical management is crucial for the diagnosis and treatment of both *in situ* and invasive primary CM, with an overall 5-year survival rate of 92%. The lesion is removed with safety margins, and then analyzed to determine the CM stage (which depends on the lesion location (epidermis or dermis) and thickness). However, when the surgical excision is inappropriate or the tumor is located in the sinonasal, nasopharyngeal and oral regions, the second-line treatment option (radiotherapy) is recommended (RIGON *et al.*, 2015).

2.5.2. Radiotherapy

CM was long regarded as a radiotherapy-resistant cancer. This is based on the fact that melanocytes are known to repair DNA damage caused by low-dose radiation. Despite this, radiotherapy remains as an efficient second-line treatment option for the management of CM (BARKER and LEE, 2012). Definitive radiotherapy is appropriate for certain well-defined situations to prevent recurrence, as medical inoperability, ocular melanoma, LMM and mucosal melanoma. Radiotherapy also plays a crucial role in the management of patients with advanced stage and metastatic CM disease (BARKER and LEE, 2012).

2.5.3. Chemotherapy

2.5.3.1. Topical

Imiquimod is a drug that can be used as monotherapy in CM *in situ* or as adjuvant in later stages. It activates the innate immune system via toll-like receptor 7 and 8 (TLR7/8). Imiquimod has been reported to be a safe and alternative treatment to control the cutaneous metastasis evading from the primary tumor, nevertheless, its effectiveness remains doubtful in the treatment of subcutaneous metastases (MISHRA *et al.*, 2018, VERGA *et al.*, 2019). 5-fluorouracil (5-FU) is a pyrimidine analogue that has also been topically used to treat solid tumors including CM, as an anticancer drug. It interferes with nucleoside metabolism, especially by inhibiting the enzyme synthetase synthase, and it can be incorporated into DNA and RNA, leading to cytotoxicity and cell death. In CM cases with poor prognosis, topical treatment with 5-FU converts the infiltrate of inflammatory cells to T-cells, culminating in an improved immune response (SIMOES *et al.*, 2015).

2.5.3.2. Systemic

Systemic chemotherapy always had an important role in the treatment of CM. There are two anticancer drugs specifically used to treat CM, but many others are being explored, alone or in combination. The major problem of the conventional chemotherapeutic agents is their adverse side effects on healthy cells, since these chemicals are administered systemically (MISHRA *et al.*, 2018).

Dacarbazine was approved by the *Food and Drug Administration* (FDA) in 1975, and is so far the unique FDA approved anti-melanoma chemotherapeutic agent. It is an alkylating chemotherapeutic drug (inhibits cancer cells division and growth) administered by intravenous injection, and it is considered the standard treatment for metastatic melanoma, constituting the basis of several anti-melanoma combinations (MISHRA *et al.*, 2018).

Temozolomide has been studied as a substitute of dacarbazine due to its oral intake advantage. Furthermore, it can penetrate into the *central nervous system*, having the potential to treat CM brain metastasis. Several studies concluded that no difference exists between the effect and efficiency of dacarbazine and temozolamide as anti-melanoma drugs. This drug failed to show any therapeutic advantage over dacarbazine, therefore the choice between the two of them depends on the preferred route of administration, presence of brain metastasis, availability and cost (MISHRA *et al.*, 2018).

2.5.4. Immunotherapy

Melanoma cells exhibit multidrug resistance (MDR) to anticancer drugs, thereby it is crucial to look for new therapeutic strategies. A possible alternative is immunotherapy, which increases the clearance of skin cancer cells and improves the immune response (RODRIGUEZ-CERDEIRA *et al.*, 2017). Recently, immunotherapies such as immune checkpoint inhibitors have revolutionized the CM treatment. Programmed cell death protein-1 (PD-1) and cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4 (CTLA-4) are the most studied immune-checkpoint receptors. Antibodies that blocks the expression of PD-1 and CTLA-4 increase T-cell immune responses, leading to improved survival in patients. However, only a subset of patients benefit from this therapy, since auto-immune toxicity, due to their mechanism of action, requires careful monitoring (O'REILLY and LARKIN, 2017). Ipilimumab, nivolumab, interferon-alpha (IFN- α) and interleukin-2 (IL-2) are the most commonly used immunostimulators for CM treatment (FRANKLIN *et al.*, 2017).

Ipilimumab is a monoclonal IgG1 antibody that binds to CTLA-4 receptors (responsible for T-cell activation), blocking the interaction of the CTLA-4 receptor with its natural ligands (CD80/CD86), therefore increasing T-cell activation and proliferation, which consequently allows the destruction of cancer cells. Ipilimumab was approved by FDA in

2011 for the treatment of CM and clinical studies have confirmed that it can induce durable responses, as well as improve the overall survival rate in metastatic melanoma patients. Treatment with ipilimumab overactivates T-cells due to the removal of CTLA-4-mediated protection, which might lead to immune-related adverse events (FRANKLIN *et al.*, 2017).

Nivolumab is a genetically engineered IgG4 monoclonal antibody that binds to PD-1 and inhibits interaction with its ligands: Programmed Death-Ligand I and II (PD-L1 (CD274) and PD-L2 (CD273)). Clinical studies of nivolumab showed its effectiveness for treating melanoma, renal cell carcinoma (RCC), non-small-cell lung cancer (NSCLC), and other types of cancer. Based on these results, phase III trials were initiated to compare the efficacy of nivolumab, first in patients previously treated with the standard chemotherapeutic agent, and then as a first-line treatment. As nivolumab is very active in some groups of patients, it is important to keep in mind the need for predictive biomarkers that will define the therapy (FRANKLIN *et al.*, 2017).

IFN- α is a cytokine released in the presence of cancer cells or in response to pathogens. IFN- α was the first exogenous cytokine to demonstrate anticancer activity in advanced melanomas, and it was approved by FDA in 1996 for use in adjuvant therapy in patients that exhibit high risk of reoccurrence after CM surgical resection. In order to reduce toxicity, studies have been conducted to compare IFN- α administered in high doses *versus* IFN- α at lower doses. Lower doses revealed less toxicity, but also lower efficacy in delaying the disease progression (TARHINI *et al.*, 2012).

IL-2 was the second exogenous cytokine to demonstrate anticancer activity in melanoma. In fact, it was approved by FDA in 1998 for the treatment of metastatic melanoma. It is a recombinant hormone of the immune system described as “growth factor for T cells”, which acts by stimulating T-cell proliferation and function. IL-2 has been tested in combination with other drugs, namely with dacarbazine and IFN- α and has shown therapeutic benefits. IL-2 can cause side effects, such as cardiovascular toxicity, gastrointestinal effects, hepatotoxicity and nephrotoxicity that can be severe. Patient monitoring is crucial because of the risk of multiorgan failure (ROSENBERG, 2014).

2.5.5. Targeted therapy

Targeted therapies are treatments which aim to inhibit biochemical pathways that are activated due to mutations in tumors. CM can be targeted by passive or active strategies to ensure that the drugs lead to cancer cells' apoptosis without causing damage to the healthy surrounding cells. BRAF and MEK inhibitors are commonly used in targeted therapy (AMANN *et al.*, 2017).

BRAF is an oncogene that induces the constitutive activation of the RAS–RAF–MEK–ERK signaling pathway. It corresponds to the oncogene that mutates more frequently in melanoma, thus *BRAF* inhibitors can be used to induce the regression of melanoma metastases. Two agents of this category are currently approved in Europe for the treatment of patients with *BRAF*-mutant melanoma: dabrafenib and vemurafenib (GOLDINGER *et al.*, 2013). Dabrafenib is a potent oral *BRAF* inhibitor that is more selective for mutated *BRAFV600E* compared to wild-type *BRAF* gene. This drug can also be used when melanoma cells begin to spread to other body sites. Vemurafenib is an oral *BRAF* inhibitor that is also more selective for mutated *BRAFV600E*. Vemurafenib evidences antiproliferative activity in melanoma cells, which results in reduced proliferation of cancer cells (MACKIEWICZ and MACKIEWICZ, 2018). The use of these inhibitors shows some limitations, as the toxicity associated with their use, and the development of adaptive immune resistance. Regarding the toxicity of each of them, a greater frequency of photosensitivity is observed in patients treated with vemurafenib, whereas in those treated with dabrafenib the most observed event is pyrexia (MACKIEWICZ and MACKIEWICZ, 2018).

MEK inhibitors are allosterically binding agents that cause cell cycle blockage. An example is trametinib, which inhibits both mitogen-activated protein kinase I and II MEK1 and MEK2. This agent blocks the activity of the previous abnormal proteins that send signals for dividing cancer cells. As therapy with trametinib has shown promising outcomes, this drug was approved by the FDA in 2013 for the treatment of patients holding *BRAFV600E* or *BRAFV600K* mutations. In comparison, MEK inhibitors show a distinct toxicity profile than *BRAF* inhibitors, with papulopustular rash being the most common adverse effect (AMANN *et al.*, 2017).

Besides the developments assisted so far, the main alarming challenges of the current CM therapies are: (i) the low response rate; (ii) CM heterogeneity; (iii) detection in advanced stages of the disease; (iv) and recurrence. In this sense, it is important to use incoming and reliable data to develop new alternative therapeutic and diagnostic strategies to fight CM. One possible and auspicious innovative technological strategy is the application of nanotechnology-based drug delivery systems to target the heterogeneous subpopulations of CM and to prevent the disease progression (MUNDRA *et al.*, 2015), as it is going to be discussed next.

3 | Application of nanosystems in cutaneous melanoma therapy

Despite the efforts in the field of CM treatment, this malignancy continues to be a health challenge due to its aggressive nature. Amongst the pharmaceutical scientific community, nanotechnology-based drug delivery systems encompass a range of structures that evidence at least one dimension with a particle size inferior to 1000 nm. Nanodelivery systems enable the synergetic combination of therapies against the recurrent and aggressive CM (BERCIANO-GUERRERO *et al.*, 2014). This is possible due the possibility of circumventing the two major limitations of the available CM therapies: MDR and adaptative immune resistance, as well as the toxicity of some conventional chemotherapeutic agents, such as dacarbazine. Thanks to the aforementioned functionalities, nanosystems provide several particular advantages over the available CM therapies since, besides enhancing the anticancer agents stability, those enhance the drug solubility, extend the drugs half-life, thus improving the anticancer agents bioavailability, and also improve the drug permeability through the cellular membrane (by targeting specifically cancer cells), ultimately delivering the drugs in a controlled and sustained manner, subsequently reducing adverse side effects (MARKMAN *et al.*, 2013). Nanosystems may be classified regarding their nature in: (i) organic nanosystems, such as nanoemulsions, vesicular systems (liposomes and micelles), polymeric NPs, lipid NPs, protein NPs, cyclodextrins and dendrimers; and (ii) inorganic nanosystems, which include metallic NPs (copper, gold and silver NPs), magnetic NPs, quantum dots, calcium phosphate NPs, silica NPs and carbon nanosystems (e.g. carbon nanotubes and graphene) (Figure 4) (BERCIANO-GUERRERO *et al.*, 2014). Advantages and disadvantages of distinct nanosystems used for CM therapy are described in Annex I.

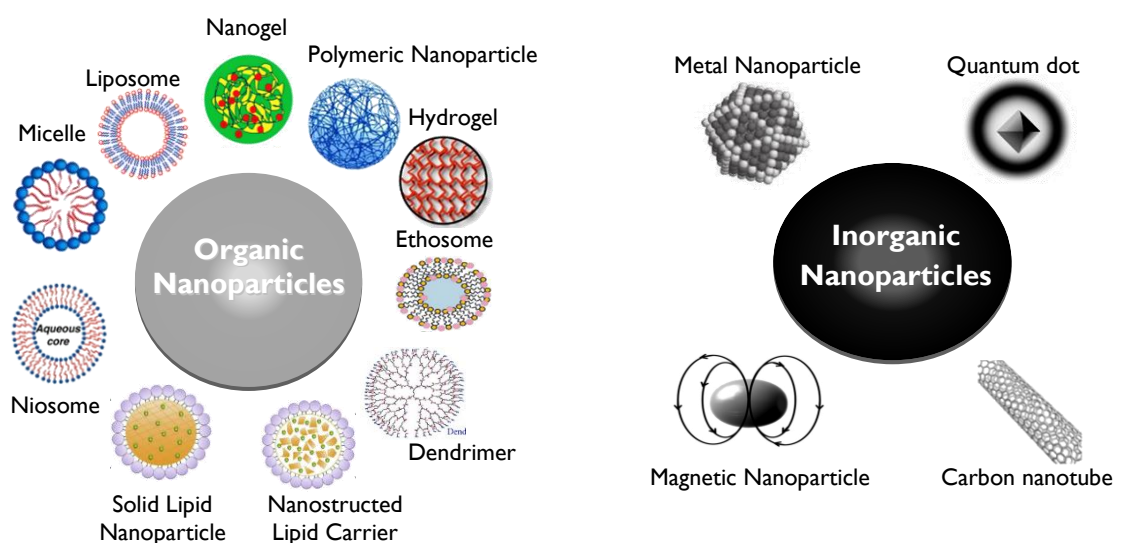


Figure 4. Classification of nanosystems used for cutaneous melanoma (CM) therapy, according to their organic or inorganic natures.

Several physicochemical properties of nanosystems, particularly, surface charge, particle size, and shape, are critical to pharmaceutical formulation development due to their influence on the anticancer agents' pharmacodynamics and pharmacokinetics (Figure 5) (WICKI *et al.*, 2015).

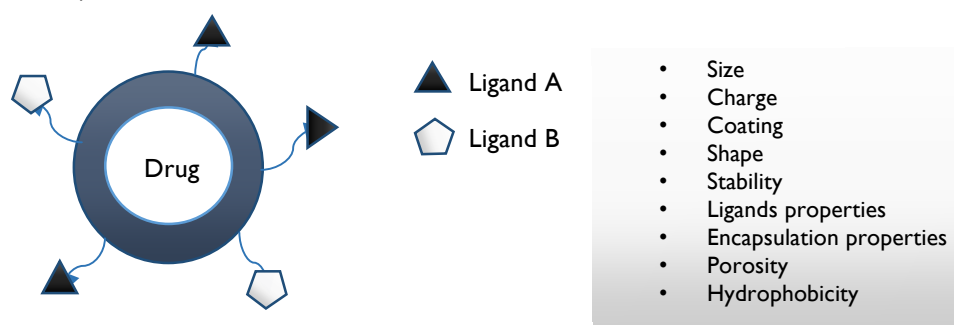


Figure 5. Nanosystems physicochemical properties that affect their therapeutic performance.

The surface charge interferes with the uptake by the reticuloendothelial system (RES) cells and affects the nanosystems biodistribution (PAUTU *et al.*, 2017). The electrostatic potential at the electrical double layer of a NP in suspension is designed zeta potential (ZP). The ZP is the quantifiable parameter that gives information regarding the surface charge of the nanosystem. Theoretically, ideal ZP values of nanosystems should be located between -30 and $+30$ mV, for the cases of electrostatic stabilization (PAUTU *et al.*, 2017).

Particle size is a key factor influencing the biodistribution of the nanosystems. On one hand, nanosystems need to be small enough to prevent the capture by macrophages in the RES, but, on the other hand, those should be large enough to prevent leakage from capillaries, allowing for a longer circulation in the bloodstream. Thus, it has been determined that the ideal particle size should be between 100-200 nm. Polydispersity index (PDI) is an indicator of the particle size distribution of the NPs (BHATTACHARJEE, 2016). The shape of the nanosystems also influences their recognition and biodistribution. The variety of materials and producing techniques used in the development of nanosystems generate a diversity of shapes (ellipses, spheres, disks, cubes, cones, filaments, rods and others) (TOY *et al.*, 2014).

Drugs might be encapsulated, covalently attached or adsorbed to the nanosystems. Nanosystems can encapsulate lipophilic and hydrophilic agents and might be also applied in the delivery of hydrophilic biomacromolecules (e.g., small interfering RNAs (siRNAs)). The encapsulation of drugs overcomes their physicochemical limitations, and avoids their degradation, thus increasing the therapeutic effect (PAUTU *et al.*, 2017). The encapsulation efficiency (EE) corresponds to the ratio between the concentration of the incorporated drug and the initial concentration used to prepare the formulation, indicating the percentage of drug that is successfully entrapped into the NP. Differently, the drug loading

(DL) corresponds to the amount of total entrapped drug divided by the total NP weight (PAUTU *et al.*, 2017).

Several studies are underway to demonstrate how a diverse spectrum of nanosystems may be used to overcome cancer resistance and bolster the anticancer available therapies. Currently, in the oncology field, nanosystems are being applied indifferent approaches. A schematic overview of approaches for CM treatment is presented in Figure 6 (DAGA *et al.*, 2016).

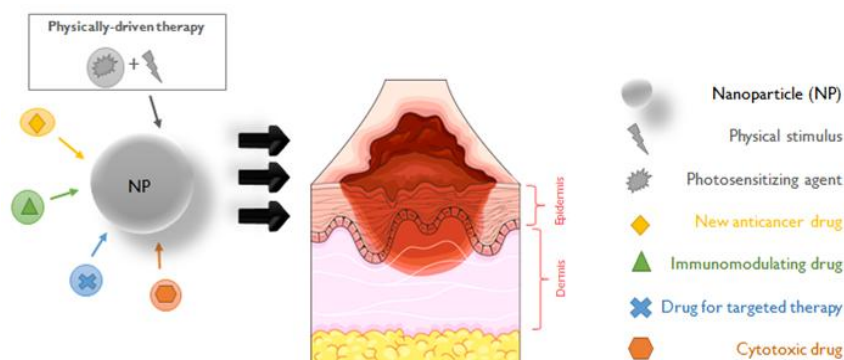


Figure 6. Types of nanotherapeutic approaches for cutaneous melanoma (CM) treatment.

A detailed discussion of the studies hitherto published concerning the application of nanosystems in CM therapy, categorized by the administration route, is presented next.

3.1. Topical administration

3.1.1. Nanoemulsions

Zinc phthalocyanine (ZnPc) is a promising lipophilic photosensitizer agent (PS) used in skin cancer topical *photodynamic therapy* (PDT). The PS is required to be applied on the skin surface that coats the solid tumor, and must penetrate the skin and the cancer cells membrane, as well as accumulate in the cancer cells cytosol. Afterwards, the skin-coated solid tumor is irradiated with a light source at a wavelength suitable to excite the PS (ZnPc absorbs light in a wavelength range between 600-800 nm), leading to the formation of reactive oxygen species (ROS) that induce damages in the tumor vasculature and promote cancer cells apoptosis, consequently leading to the solid tumor tissue necrosis (MONGE-FUENTES *et al.*, 2014). However, in technological terms, the high lipophilicity of ZnPc impairs its direct topical administration. Oil-in-water (O/W) nanoemulsions are conventional technological alternatives widely used to deliver lipophilic drugs to the skin. The lipophilic nature of ZnPc enables its incorporation into the oily phase (internal) of an O/W nanoemulsion (DALMOLIN and LOPEZ, 2018). Therefore, towards the solubilization of ZnPc, a cationic nanoemulsion was developed using ultrasound. The nanoemulsion was

characterized (see results in Annex 2) and the cutaneous penetration studies using iontophoresis (physical method to enhance skin penetration) were performed in melanoma-bearing C57BL/6 female mice. The melanoma-bearing mice were treated topically with the developed nanoemulsion containing ZnPc using a constant electric current of 0.5 mA/cm², and three different iontophoresis treatment times (5, 15 and 30 min). After the treatments, the tumor was removed for analysis. The *in vivo* study showed that ZnPc penetrates the solid tumor after a iontophoresis treatment time of 30 min. According to the previous results, the combination of iontophoresis and the incorporation of lipophilic PSs in nanoemulsions have a positive impact in the effectiveness of CM topical PDT (DALMOLIN and LOPEZ, 2018).

3.1.2. Liposomes

Liposomes consist of one or more phospholipid bilayers surrounding an aqueous core that is able to encapsulate drugs. These lipid-based nanosystems are able to penetrate the *stratum corneum*. The administration of liposomes using a physical skin penetration technique, such as anodal iontophoresis overcomes the skin barrier properties improving liposomes skin penetration (CARITA *et al.*, 2018).

JOSE *et al.* (2018) evaluated the effectiveness of the iontophoretic co-delivery of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) siRNA and curcumin using cationic liposomes against CM. Several studies have shown that STAT3 gene silencing inhibits tumor development in multiple cancer types, including CM, thus it was hypothesized that combining the STAT3 siRNA with curcumin (a natural anticancer drug) would synergetically inhibit CM progression. Concomitantly, the iontophoresis would improve the skin penetration of the topical nanoformulation. Curcumin was encapsulated in the aqueous core of the liposomes, and the STAT3 siRNA was anchored to the surface of the liposomes, forming a nanocomplex. The nanocomplex was further characterized (the results are depicted in Annex 2). The nanocomplexes cellular uptake in B16F10 mouse melanoma cells occurred within 30 min, and the co-delivery of both therapeutic agents significantly inhibited CM growth, compared with either curcumin-loaded liposomes, or STAT3 siRNA surface-functionalized cationic liposomes. Subsequently, *in vivo* efficacy studies were performed in a melanoma-bearing C57BL/6 mice model. The co-administration of STAT3 siRNA and curcumin using liposomes substantially inhibited tumor progression. Furthermore, the topical iontophoretic co-administration showed similar effectiveness compared with intratumoral administration. It is possible to conclude that cationic liposomes can be used for the

combined administration of natural and biopharmaceutical anticancer agents, constituting a promising non-invasive topical treatment for CM (JOSE *et al.*, 2018).

3.1.3. Carbon-based nanosystems

Carbon-based materials such as carbon nanotubes (CNTs), fullerenes, nanodiamonds and graphene have been used in several medical approaches. Several studies have been performed with CNTs, which are cylindrical forms of one (single-wall) or more (multi-wall) layers of graphene. Drugs can be loaded inside the CNTs or attached to the surface via functional groups, through covalent or noncovalent bonding (MADANI *et al.*, 2011). SIU *et al.* (2014) have used CNTs to topically deliver siRNA *in vivo*. Therapeutic siRNAs regulate gene expression; however, efficient delivery of siRNAs *in vivo* is limited due to the siRNAs high molecular weight and short half-life. In this sense, it has been shown that CNTs can be used to protect siRNA and facilitate cell penetration, enhancing siRNA transdermal delivery. In this study, single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) were developed to deliver BRAF siRNA. The nanocomplexes were characterized, and the gene silencing efficiency was evaluated *in vitro* and *in vivo*. SWCNTs were noncovalently functionalized with succinated poly (ethyleimine) (PEI) in order to obtain a nanosuspension able to anchor and deliver the BRAF siRNA. The gene silencing efficiency of the BRAF siRNA functionalized SWCNTs was evaluated in B16F10 cells. The percentage of BRAF downregulation was about 80%, resulting in the inhibition of B16F10 cells proliferation. The transdermal siRNA delivery using SWCNTs was also tested *in vivo* in a B16F10 melanoma-bearing C57BL/6 murine model during a total of 25 days-period. After topical application, it was observed a significant uptake of labeled BRAF siRNA, as well as a significant attenuation of tumor proliferation. This carbon-based inorganic nanosystems are promising therapeutic siRNAs delivery systems, and might be further applied in the topical treatment of CM, as well as additional types of solid cancers (SIU *et al.*, 2014).

3.2. Intraperitoneal

3.2.1. Albumin nanoparticles

Curcumin is a natural polyphenol capable of inhibiting cancer cell proliferation and invasion, as it can suppress signaling pathways and inhibit the activity of important transcription factors involved in angiogenesis. However, poor aqueous solubility and instability at physiological pH, that result in a known low oral bioavailability, it shows limited therapeutic activity as well as limited clinical application when administered in the free form (KUNNUMAKKARA *et al.*, 2017). In order to overcome these constrains, studies focused

on the nanoencapsulation of curcumin have been performed (LIU *et al.*, 2016). CAMARGO *et al.* (2018) carried out a study where curcumin loaded in bovine serum albumin (BSA) NPs were developed, physicochemically characterized, and evaluated in *in vitro* and *in vivo* assays. The results regarding the BSA NPs characterization are depicted in Annex 2. The *in vitro* drug release assay demonstrated that curcumin-loaded BSA NPs evidenced a bimodal release pattern. First, an initial burst effect is observed, due to desorption of the drug from the BSA NPs surface, followed by a slower release phase, explained by the diffusion of curcumin from the BSA matrix. The BSA NPs cytotoxicity activity was evaluated in BI6F10 melanoma cells. In this assay, curcumin-loaded BSA NPs were less efficient than free curcumin, since the murine melanoma cells viability was reduced to 55% after exposure to curcumin-loaded BSA NPs, and 45% after exposure to free curcumin (CAMARGO *et al.*, 2018). In the *in vivo* assay, a C57BL/6J murine melanoma model was used to evaluate the anticancer activity, and the treatments were administered intraperitoneally for 10 days. By the 29th day after treatment, the survival rate decreased to 0% and 25% in the free curcumin treatment group and in the group treated with curcumin-loaded BSA NPs, respectively. The animal groups that were injected intraperitoneally with free curcumin and curcumin-loaded BSA NPs, revealed slower tumor progression. By the end of the treatments, the tumor volume of the group treated with free curcumin was *ca.* 1.5 mm³, whereas the tumor volume of the group treated with curcumin-loaded BSA NPs was *ca.* 0.5 mm³. In contrast with the *in vitro* results, in the murine melanoma model, curcumin-loaded BSA NPs exhibited higher anticancer activity than free curcumin. Overall, the *in vivo* results revealed that BSA NPs improve the anticancer efficacy of curcumin. Thus, BSA NPs might have relevant applications in CM therapy (CAMARGO *et al.*, 2018).

3.3. Intravenous administration

3.3.1. Solid lipid nanoparticles (SLNs)

SLNs are submicron-sized lipid emulsions formed by solid lipids at room temperature, stabilized by one or more surfactants. Those emerged as alternative nanosystems to the existing conventional delivery systems, such as liposomes, and polymeric NPs (NASERI *et al.*, 2015). In the context of skin cancer, a nanosystem that can co-transport chemotherapeutic agents and microRNAs to their targets may be an attractive strategy for skin cancer therapy. In this sense, Shi and coworkers (2014) developed a nanosystem to co-delivery paclitaxel (PTX), a chemotherapeutic drug (ZHU and CHEN, 2019), and an endogenous microRNA (miR-34a), a cancer specific oncogene that is usually downregulated (LI, 2014), aiming a synergistic antimelanoma therapy (SHI *et al.*, 2014). This way, miR-34a

and PTX were co-encapsulated into cationic SLNs (miSLNs-34a/PTX) and the physicochemical properties of this nanosystem were characterized, being the results described in Annex 2. *In vitro* studies confirmed the cellular uptake by endocytosis and evidenced a synergistic anticancer activity of miR-34a and PTX, suggesting that their co-delivery by SLNs improved their anticancer effect in comparison with miR-34a or PTX separately loaded in SLNs. The *in vivo* studies were performed in mice xenografted with CD44 antigen-expressing B16F10 cells, after the intravenous administration of miSLNs-34a/PTX to treat melanoma lung metastasis. The developed nanosystem protected both therapeutic molecules from degradation in plasma serum, and exhibited passive targetability to lung tissues. The co-delivery nanosystem was more effective in inhibiting tumor growth and eliminating melanoma metastases in the lungs than single miR-34a-loaded and PTX-loaded SLNs. It can be concluded that this technological approach offers a promising antimelanoma therapeutic strategy (SHI *et al.*, 2014).

3.3.2. Nanostructured lipid carriers (NLCs)

Docetaxel (DTX), similarly with PTX, is a semisynthetic taxoid that derives from *Taxus baccata* considered as a mitotic spindle poison that blocks microtubule depolymerization. DTX shows low water solubility, therefore an injectable formulation denominated Duopafei[®] was prepared with high concentrations of Tween 80. The problem is that Tween 80 is associated with hypersensitivity reactions (DA SILVA *et al.*, 2018). Bearing this in mind, researchers have developed a lipid-based nanosystem without Tween 80 to deliver DTX. A nanostructured lipid carrier (NLC) consists in a solid lipid matrix with spatially incompatible liquid lipids, resulting in a flexible structure with higher drug loading (DL) capacity when compared to a SLN. LIU *et al.* (2011) have produced a DTX-loaded NLCs (DTX-NLCs) nanoformulation to improve DTX therapeutic effectiveness and reduce its toxicity. The DTX-NLCs particle size, ZP, EE and DL were characterized (results in Annex 2). *In vitro* studies were carried out to compare the Duopafei[®] and the DTX-NLCs. The kinetic drug release assays showed a sustainable DTX release from the DTX-loaded NLCs. The anticancer activity was tested in B16F10 cells and in three human cancer cell lines (human hepatocellular liver carcinoma (HepG2 cell line), ovary cancer cells (SKOV3 cell line) and lung adenocarcinoma (A549 cell line)). Duopafei[®] and the DTX-NLCs exhibited a dose-dependent cytotoxicity profile, however DTX-NLCs showed higher toxicity to melanoma cancer cells. NLCs might enhance the intracellular accumulation of DTX by endocytosis, improving DTX therapeutic efficacy (LIU *et al.*, 2011). The *in vivo* anticancer efficacy of Duopafei[®] and DTX-NLCs was assessed in B16F10 melanoma-bearing mice, after

intravenous administration for a time-period experiment of 20 days. The inhibition ratio (IR) was calculated. The IR values of DTX-NLCs (20 mg/kg), DTX-NLCs (10 mg/kg) and Duopafei® (10 mg/kg) were 90.4%, 62.7% and 42.7%, respectively. DTX-NLCs were more effective than Duopafei® in delaying the tumor development, which can be explained by the following reasons: (i) the structure of NLCs may increase DTX solubility; (ii) the particle size and ZP of NLCs may maintain DTX stably entrapped in the lipid matrix; (iii) DTX can be slowly delivered from DTX-NLCs, thus the *in vivo* exposure to DTX is continuous, and its plasma concentration is constant. Additionally, the mice weight loss induced by DTX-NLCs was lower in comparison to that induced by Duopafei®. The authors have suggested that this mice body weight loss reduction is related to the DTX-NLCs reduced *in vivo* toxicity. These results have led to the conclusion that DTX-NLCs generate less toxicity than Duopafei® when administered intravenously. The aforementioned *in vitro* and *in vivo* experiments have suggested that DTX-NLCs might be a promising nanosystem to be applied in CM therapy (LIU *et al.*, 2011).

3.3.3. Polymeric micelles

Polymeric micelles are core-shell nanostructures obtained through the assembly of amphiphilic block copolymers by hydrophobic or ion pair interactions. Polymeric micelles can be used to enhance targeted delivery and improve the therapeutic effects of the drugs (DESHMUKH *et al.*, 2017). PEG is a hydrophilic and non-toxic polymer commonly used to solubilize drugs; poly (lactic acid) (PLA) is a biodegradable and biocompatible biomedical polymer. Polymeric micelles formed by block copolymers composed of PEG-PLA have been widely studied for decades in order to improve drugs solubility and bioavailability. Hydrophobic drugs can be encapsulated in the PLA core (hydrophobic) and covered by the PEG shell (hydrophilic) (ZHANG *et al.*, 2014). WANG *et al.* (2017) have formulated curcumin-loaded amphiphilic PEG-PLA polymeric micelles to improve curcumin anticancer activity and decrease its side effects. First, the PEG-PLA polymeric micelles were physicochemically characterized regarding size, ZP, EE and DL capacity (see Annex 2). In the *in vitro* drug release assay, curcumin was released from the PEG-PLA polymeric micelles in a sustained manner. In B16F10 murine melanoma cells, the PEG-PLA polymeric micelles have enhanced the curcumin uptake. In addition, the curcumin-loaded PEG-PLA polymeric micelles evidenced higher cytotoxicity than free curcumin and induced apoptosis. The *in vivo* experiments were carried out in B16F10 melanoma-bearing mice. Here, the polymeric micelles suppressed tumor growth, exerting antimelanoma activity without any significant impact on the mice body weight. An immunohistochemical assay

revealed that polymeric micelles also inhibited the neovascularization of tumor tissues. Summarizing, curcumin-loaded PEG-PLA polymeric micelles have clinical potential to be applied in the treatment of CM (WANG *et al.*, 2017).

3.3.4. Gold nanoparticles

Gold NPs are a class of inorganic NPs. Integrins are transmembrane proteins exploited in cancer as cancer molecular targets due to their overexpression in some types of cancers (e.g. melanoma, glioblastoma). Integrins activation occurs only upon the binding of extracellular ligands (lack of intrinsic enzymatic activity), resulting in the activation of signaling pathways that regulate cancer cells survival, proliferation, invasion and migration (DESGROSELLIER and CHERESH, 2010). The expression of the $\alpha\beta3$ integrin has been associated with melanoma neoangiogenesis. It was discovered that $\alpha\beta3$ integrin recognizes the sequence of the tripeptide arginine-glycine-aspartic acid (RGD) present in extracellular matrix proteins (e.g. fibronectin). Recently, targeting $\alpha\beta3$ integrin has been explored in melanoma therapy. In this sense, several antagonists of $\alpha\beta3$ integrin have been tested in CM therapy (GOODMAN and PICARD, 2012).

The work of ALBERTINI *et al.* (2019) has described a theranostic strategy based on AuNPs coated with the Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-NH₂ (GRGDG-NH₂) pentapeptide for CM. The pentapeptide was selected because it recognizes and binds to the $\alpha\beta3$ integrin expressed in CM cells. For the *in vitro* tests, three cancer cell lines expressing $\alpha\beta3$ integrin were chosen: murine melanoma B16F10, murine gliosarcoma 9L and human glioblastoma U87 cell lines. For the further *in vivo* studies, two different B16F10 melanoma cell models - subcutaneous and intracranial - were selected. The first one was selected for its reproducibility, while the intracranial one was chosen to evaluate the brain targeting ability, since B16F10 cells generally metastasize to the brain. In all the experiments, three different nanosystems were tested: blank AuNPs, PEG-coated AuNPs and GRGDG-functionalized AuNPs (ALBERTINI *et al.*, 2019). The levels of $\alpha\beta3$ integrin expression *in vitro* (in B16F10, 9L and U87 cell lines) were assessed by flow cytometry. B16F10 and U87 expressed much higher levels of $\alpha\beta3$ integrin compared to 9L cell line (54%, 81% and 9%, respectively). The cellular uptake of NPs was assessed only in B16F10 cells. This murine melanoma cell line was able to uptake all the three nanoformulations, but GRGDG-functionalized AuNPs were internalized more effectively. The B16F10 cell line forms a characteristic network when it grows on Matrigel[®] (gelatinous protein mixture secreted by Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma cells). Thus, ALBERTINI *et al.* (2019) have studied how the three nanosystems affected the network formation, to obtain data about their ability to minimize

the cancer cells migration, limiting network formation and tumor invasion. Results indicated that GRGDG-functionalized AuNPs drastically inhibited the Matrigel[®] network formation compared to blank AuNPs and PEG-AuNPs, being this ascribed to the ability of GRGDG-pentapeptide to act as an $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin antagonist (ALBERTINI *et al.*, 2019). Given the promising results obtained *in vitro*, GRGDG-functionalized AuNPs were tested *in vivo*. In the subcutaneous B16F10 melanoma-induced mice model, nanosuspensions containing blank AuNPs, PEG-coated AuNPs and GRGDG-functionalized AuNPs were injected intravenously. Similarly to PEG-coated AuNPs, the GRGDG-functionalized AuNPs showed a plasma half-life higher than blank AuNPs, but their accumulation in spleen and liver was lower (more accumulation in the brain and lungs). This accumulation pattern may be due to the presence of lung and brain metastases, since B16F10 cells have been used to create these metastases in animal models. In this experiment the authors have not observed macroscopic metastases, but the existence of micrometastases was not neglected. After a 2h post-injection interval, the GRGDG-functionalized AuNPs accumulation in the tumor was 3.7-fold higher than blank AuNPs tumor accumulation, and 1.2-fold higher than PEG-coated AuNPs. After an 8 h post-injection period, the GRGDG-functionalized AuNPs remained in the tumor site. In the intracranial model, five days after intracranial B16F10 cells injection, nanosuspensions containing blank AuNPs, PEG-coated AuNPs and GRGDG-functionalized AuNPs were injected intravenously. After a 2 h post-injection interval, the brain accumulation of GRGDG-functionalized AuNPs was 1.5-fold higher than that of blank AuNPs and 5-fold higher when compared to the brain accumulation of PEG-coated AuNPs. Thereupon an 8 h post-injection period, the GRGDG-functionalized AuNPs still persisted in the brain, while the other AuNPs became undetectable. The biodistribution results obtained from this model corroborated the hypothesis that the GRGDG-AuNPs brain accumulation is due to $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin receptor-mediated endocytosis that occurs on the blood brain barrier (BBB). Another explanation for the GRGDG-functionalized AuNPs brain accumulation is the overexpression of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin in the tumor itself (ALBERTINI *et al.*, 2019). GRGDG-functionalized AuNPs might thereby be further applied as a CM theranostic agent.

3.4. Intradermal administration

3.4.1. Nanoemulsions

Recent studies have been claimed that the combination of nanotechnology and air cold atmospheric plasma (CAP) is beneficial for the treatment of cancer. CAP is considered a developing biomedical technique that generates reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), charged particles and UV rays. CAP induces physicochemical

changes in biological organisms, modifying the membranes permeability and leading to the diffusion of NPs towards damaged tissues (YAN *et al.*, 2017). In this sense, in ADHIKARI *et al.* (2019) study, CAP was used along with a silymarin nanoemulsion as a CM co-treatment. Firstly the silymarin-loaded nanoemulsion was characterized in terms of particle size and PDI (see Annex 2) (ADHIKARI *et al.*, 2019). Afterwards, *in vitro* studies were assessed on G-361 human melanoma cells, and the following parameters were evaluated: (i) ROS and RNS levels; (ii) melanoma specific biomarkers; (iii) DNA damage; (iv) caspase activation; and (v) the expression levels of the poly ADP-ribose polymerase-I (PARP-I) and apoptotic genes. The effects on the hepatocyte growth factor (HGF) and on the hepatocyte growth factor receptor (c-MET) pathway and on the epithelial–mesenchymal transition (EMT) process were also evaluated. The results showed that the co-treatment induced a 2-fold increase in RNS and 3-fold increase in ROS generation compared to the control samples. The DNA damage studies were performed by estimating the level of DNA methyltransferase (DNMT). The level of DNMT enzyme had a 2-fold reduction; the level of γ -H2AX, a biomarker for DNA double-strand breaks, suffered an 1.8-fold increase; and the expression level of PD-I had a 2-fold increase. The expression of caspases 3, 7, 8 and 9, as well as the expression of apoptotic genes (p53, ATM, BAX, Bcl-2) and PARP-I activity levels were also increased in the co-treated group. The co-treatment with CAP and the silymarin nanoemulsion blocked the HGF/c-MET pathway. The binding of the HGF ligand induces the hyperactivation of c-MET (hepatocyte growth factor tyrosine kinase receptor) - when the HGF ligand binds - plays a crucial role in melanoma progress. The co-treatment resulted in a denoting reduction in the c-MET expression levels. Furthermore, the results evidenced a reduction in the expression of the stem cells (ABCB5, CD133), melanoma-specific (e.g. BRAF) and EMT biomarkers (SNAIL1, YKL-40, N-cadherin). EMT is a biological process responsible for the cancer cellular invasiveness and the formation of metastatic cancers. The CAP and silymarin nanoemulsion combined treatment effectively decreased the *in vitro* G-361 cells invasiveness due to the suppression of the EMT (ADHIKARI *et al.*, 2019). Due to promising *in vitro* results, the co-treatment with CAP and the silymarin nanoemulsion was performed *in vivo* in a G-361 human melanoma cells xenografted nude mice model. The silymarin nanoemulsion was firstly administrated to the human melanoma xenografted mice, and after 1 day the CAP treatment was intradermally administrated. The co-treatment reduced tumor weight by 50% and decreased the tumor volume compared to the groups. Histological differences were also observed. Nuclei were highly condensed (apoptosis) in the tumor sections of the co-treated groups. Furthermore, the immunohistochemical evaluation has showed that the c-MET, CD133 and BRAF expression levels were reduced. In this study, the use of a human

melanoma xenografted mice model has demonstrated that melanoma cells are more sensitive to the CAP and silymarin nanoemulsion co-treatment than to each therapeutic technology applied individually (ADHIKARI *et al.*, 2019). In conclusion, this study has suggested that the combination of a silymarin nanoemulsion with CAP suppresses the HGF/c-MET signaling pathway, avoiding the EMT in melanoma cells. These results provide a rationale to use the CAP with a targeted nanosystem as a therapy for metastatic melanoma patients.

3.5. Intratumoral administration

3.5.1. Copper nanoparticles

Inorganic nanoparticles, such as copper NPs have acquired renewed interest for cancer therapy due to their interesting properties (e.g. excellent electrical and thermal conductivities; promising candidates for cell imaging). A copper NP evidences a particle size that ranges from 1 to 100 nm (PUGAZHENDHI *et al.*, 2018).

The isolation and identification of cancer stem cells (CSCs) might be useful for cancer diagnosis and therapy, since these cells are responsible for the tumor initiation process. There are several studies supporting that CD271⁺ cells are responsible for melanoma progression and the development of multidrug resistance (KOZOVSKA *et al.*, 2016). Yu *et al.* (2017) performed a recent study with cuprous oxide nanoparticles (CONPs) to assess if these NPs could inhibit human melanoma stem cells. Two types of CD271⁺-human melanoma cell lines (WM266-4 and A375) were used to investigate the *in vitro* antimelanoma effectiveness of CONPs. The *in vitro* results concluded that CONPs entered in WM266-4 and A375 cells by clathrin-mediated endocytosis, and induced apoptosis in a dose-dependent manner in both cell lines. Lower CONPs concentrations (1.75 µg/mL) have reduced A375 and WM266-4 cell viability, downregulating the expression of SOX10 and MITF, two transcription factors involved in the melanoma-stem cells stemness maintenance and tumorigenesis. The *in vivo* experiments were performed in an A375 melanoma-bearing nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency (NOD-SCID) mice model. The tumor-bearing mice model was injected intratumorally with CONPs. The *in vivo* administration of CONPs suppressed melanoma growth, due to SOX10 and MITF downregulation. In the histological examination the YU *et al.* (2017) concluded that CONPs induced tumor tissue structural fibrosis and necrosis. These results have suggested that CONPs have potential antimelanoma applications, since these inorganic nanosystems are able to prevent melanoma initiation (YU *et al.*, 2017).

3.6. Oral administration

3.6.1. Poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles

Oral administration remains the most preferred route for drug delivery since it is painless, noninvasive and it allows high dosage flexibility. In oral administration, it may be interesting to use mucoadhesive drug delivery systems, which increase the contact of the drugs with the mucous layer of the gastrointestinal tract, thus enhancing the drug absorption and subsequently its bioavailability. One of the most used mucoadhesive polymers is chitosan. Chitosan is a natural cationic polysaccharide, presenting high biodegradability, biocompatibility and low toxicity. Chitosan interacts with mucin, a negatively charged glycoprotein present in the mucous layer (TM *et al.*, 2018). In the work of LOCH-NECKEL *et al.* (2015), chitosan was used to coat curcumin-loaded poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles (curcumin-loaded CCNPs). The nanoformulation was prepared and characterized, and the results are depicted in Annex 2. The curcumin-loaded CCNPs melanoma antimetastatic activity was assessed in *in vitro* and in *in vivo* models. (LOCH-NECKEL *et al.*, 2015). In the *in vitro* experiments, the half inhibitory concentration (IC_{50}) values of the blank chitosan-coated poly (ϵ -caprolactone) NPs, free curcumin and curcumin-loaded CCNPs were assessed in B16F10 melanoma cells. The IC_{50} value of free curcumin was lower in comparison to the IC_{50} of curcumin-loaded CCNPs, which leads to the conclusion that curcumin-loaded CCNPs are less cytotoxic than free curcumin, *i.e.*, the encapsulation of curcumin did not increase its anticancer activity *in vitro*. It is possible that curcumin nanoencapsulation makes it less available in the culture medium. The effects of free curcumin and curcumin-loaded CCNPs (at their IC_{50} values) on the mitochondrial membrane potential of B16F10 cells were also evaluated. The results showed that free curcumin and curcumin-loaded CCNPs induced the loss of the mitochondrial membrane potential of B16F10 cells, however the damage caused by free curcumin was higher. The metastatic potential of cancer cells is correlated with their ability to form clusters, therefore a cluster formation assay was performed. The results showed that curcumin-loaded CCNPs decreased the cancer cells clusters by 76.4%. Additionally, the effect of curcumin-loaded CCNPs on the migration of melanoma cells was evaluated in an *in vitro* wound healing assay. The wound-healing assay results demonstrated that free curcumin and curcumin-loaded CCNPs reduced the migration rate of cancer cells. In the last *in vitro* test performed the MMPs activity was analyzed. MMPs play a critical role in the degradation of the extracellular matrix, which allows cancer cells further migration. Thus, the inhibition of MMPs activity may be crucial to prevent cancer invasion and metastasis. The proteolytic activity of MMP-9 and MMP-2 in B16F10 cells was evaluated after

the treatment with free curcumin and curcumin-loaded CCNPs, and it was observed that both treatments significantly decreased the activity of MMP-9 and MMP-2 (LOCH-NECKEL *et al.*, 2015). The *in vivo* effects of curcumin-loaded CCNPs on the development of melanoma pulmonary metastases were evaluated in a lung cancer-bearing C57BL/6 female mice model. Mice were submitted to the orally administration once a day for 14 consecutive days of the developed nanoformulation and the controls. The number of lung nodules was assessed and interpreted as an indicator of melanoma lung metastases. Oral administration of free curcumin at doses of 3 and 6 mg/kg inhibited lung nodules formation by 20.0%, when compared with the control group; whereas mice treated with curcumin-loaded CCNPs resulted in 56.2% (3 mg/kg of curcumin-loaded CCNPs) and 64.5% (6 mg/kg of curcumin-loaded CCNPs) inhibition, respectively. The histological analysis confirmed the macroscopic results. The *in vivo* curcumin-loaded CCNPs antimetastatic effects could be attributed to different mechanisms, however the main explanation is that the chitosan coating certainly keeps the polymeric matrix degradation constant in the intestinal fluid. All the previously discussed findings indicate that curcumin-loaded CCNPs might represent a promising oral metastatic melanoma therapy approach (LOCH-NECKEL *et al.*, 2015).

4 | Concluding remarks and future perspectives

CM constitutes a heterogeneous disease that affects mostly Caucasians. The management of this skin cancer in advanced stages is still a challenge to scientists and physicians due to the MDR and adaptive immune resistance that reduce the effectiveness of current available CM therapies. The limitations of the available therapies (e.g., low response rate and recurrence) are a clear signal that is necessary to urgently design novel alternative therapeutic approaches (SIMOES *et al.*, 2015).

Nanotechnology offers an opportunity for innovation in the treatment of CM. Nanomedicines present advantages and limitations in CM therapy. The advantages are: (i) protection of anticancer drugs from degradation; (ii) reduction of adverse side effects and toxicity; (iii) possibility of specific tumor targeting; (iv) increase of anticancer drugs penetration into the cytosol of cancer cells, especially when the nanosystems are topically or intratumorally administered; and (v) increased drug tolerability and improvement of drug bioavailability and, consequently their efficacy. The limitations are, e.g., the fact that blood time residence and biodistribution depends on the surface properties of the nanosystems. Other example might be the nanosystems possible kidney and liver infiltration in case of systemic administrations. In the systemic route, drugs need to reach solid tumors which

show tortuous and fenestrated blood vessels, which difficults the task. This fact makes topical and intratumoral administration of NPs the most promising routes for this type of solid tumor (PAUTU *et al.*, 2017). Despite the advances made in recent years, nanotechnology is still a fresh subject and the effects of the long-term exposure to nanosystems are not known yet. Furthermore, due to the wide range of nanomaterials used, their toxicity may range from inert to very toxic. To apply nanotechnology in the biomedical field, it is crucial to understand the physicochemical properties of the nanosystems, their interaction with biological organisms and their by-products. Scientific research must be now focused on the effects of nanosystems on the machinery of biological systems, such as intracellular molecular targets, organelles, cells, tissues and, ultimately, organs (YANAMALA *et al.*, 2013). For a successful translation of nanomedicines to the clinical field, features such as pharmacokinetics, biodistribution, metabolism, degradation and long-term toxicity need to be considered and meticulously investigated (SIMOES *et al.*, 2015).

The new challenges and future perspectives in the development of nanotechnology-based delivery systems for CM therapy include the potential for multifunctional nanomedicines design that will fulfill therapeutic and biological requirements (e.g. targeting systems to tumor cells after systemic distribution) and the viability of upscaling techniques to readily bring the innovative CM therapeutic strategies to the pharmaceutical market. Further challenges include research on targeted anti-melanoma drugs, as well as the definition of international regulatory standards concerning nanosystems risk assessment and pharmaceutical development. Future perspectives also include using nanosystems in other breakthrough therapy regimens as phototherapy and gene therapy towards CM treatment (RIGON *et al.*, 2015).

5 | References

- ADHIKARI, M., KAUSHIK, N., GHIMIRE, B., ADHIKARI, B., BABOOTA, S., AL-KHEDHAIRY, A. A., WAHAB, R., LEE, S. J., KAUSHIK, N. K., CHOI, E. H. - Cold atmospheric plasma and silymarin nanoemulsion synergistically inhibits human melanoma tumorigenesis via targeting HGF/c-MET downstream pathway. *Cell Commun Signal*, Vol. 17. n.º 1 (2019) 52.
- ALBERTINI, B., MATHIEU, V., IRACI, N., VAN WOENSEL, M., SCHOUBBEN, A., DONNADIO, A., GRECO, S. M. L., RICCI, M., TEMPERINI, A., BLASI, P., WAUTHOZ, N. - Tumor Targeting by Peptide-Decorated Gold Nanoparticles. *Mol Pharm*, Vol. 16. n.º 6 (2019) 2430-2444.
- AMANN, V. C., RAMELYTE, E., THURNEYSEN, S., PITOCCO, R., BENTELE-JABERG, N., GOLDINGER, S. M., DUMMER, R., MANGANA, J. - Developments in targeted therapy in melanoma. *Eur J Surg Oncol*, Vol. 43. n.º 3 (2017) 581-593.
- AMARAL, T., SINNBERG, T., MEIER, F., KREPLER, C., LEVESQUE, M., NIESSNER, H., GARBE, C. - The mitogen-activated protein kinase pathway in melanoma part I - Activation and primary resistance mechanisms to BRAF inhibition. *Eur J Cancer*, Vol. 73 (2017) 85-92.
- AUTIER, P., DORE, J. F. - Ultraviolet radiation and cutaneous melanoma: a historical perspective, *Melanoma Res.* (2019).
- BARKER, C. A. LEE, N. Y. - Radiation therapy for cutaneous melanoma. *Dermatol Clin.* Vol, 30. n.º 3 (2012) 525-33.
- BELLICH, B., D'AGOSTINO, I., SEMERARO, S., GAMINI, A., CESARO, A. - "The Good, the Bad and the Ugly" of Chitosans. *Mar Drugs*, Vol. 14. n.º 5 (2016).
- BERCIANO-GUERRERO, M. A., MONTESA-PINO, A., CASTANEDA-PENALVO, G., MUNOZ-FERNANDEZ, L., RODRIGUEZ-FLORES, J. - Nanoparticles in melanoma. *Curr Med Chem*, Vol. 21. n.º 32 (2014) 3701-16.
- BERWICK, M., BULLER, D. B., CUST, A., GALLAGHER, R., LEE, T. K., MEYSKENS, F., PANDEY, S., THOMAS, N. E., VEIEROD, M. B., WARD, S. - Melanoma Epidemiology and Prevention. *Cancer Treat Res*, Vol. 167. (2016) 17-49.

- BHATTACHARJEE, S. - DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release*, Vol. 235. (2016) 337-351.
- BRYE, A. K., GOWDA, R., LORIAUX, D. B., ROBERTSON, G. P., MOSCA, P. J. - Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. *Biotechnol Adv*, Vol. 34. n.º 5 (2016) 565-577.
- CAMARGO, L. E. A., BRUSTOLIN LUDWIG, D., TOMINAGA, T. T., CARLETTO, B., FAVERO, G. M., MAINARDES, R. M., KHALIL, N. M. - Bovine serum albumin nanoparticles improve the antitumour activity of curcumin in a murine melanoma model. *J Microencapsul*, Vol. 35. n.º 5 (2018) 467-474.
- CARITA, A. C., ELOY, J. O., CHORILLI, M., LEE, R. J., LEONARDI, G. R. - Recent Advances and Perspectives in Liposomes for Cutaneous Drug Delivery. *Curr Med Chem*, Vol. 25. n.º 5 (2018) 606-635.
- DA SILVA, G. H., FERNANDES, M. A., TREVIZAN, L. N. F., DE LIMA, F. T., ELOY, J. O., CHORILLI, M. - A Critical Review of Properties and Analytical Methods for the Determination of Docetaxel in Biological and Pharmaceutical Matrices. *Crit Rev Anal Chem*, Vol. 48. n.º 6 (2018) 517-527.
- DAGA, M., DIANZANI, C., FERRARA, B., NARDOZZA, V., CAVALLI, R., BARRERA, G., PIZZIMENTI, S. - Latest news on nanotechnology for melanoma therapy and diagnosis. *SM Journal of Nanotechnology and Nanomedicine*, (2016).
- DALMOLIN, L. F., LOPEZ, R. F. V. - Nanoemulsion as a Platform for Iontophoretic Delivery of Lipophilic Drugs in Skin Tumors. *Pharmaceutics*, Vol. 10. n.º 4 (2018).
- DAMSKY, W. E., BOSENBERG, M. - Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene*, Vol. 36. n.º 42 (2017) 5771-5792.
- DAVIES, M. A. - The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer J*, Vol. 18. n.º 2 (2012) 142-7.
- DESGROSELLIER, J. S., CHERESH, D. A. - Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, Vol. 10. n.º 1 (2010) 9-22.

- DESHMUKH, A. S., CHAUHAN, P. N., NOOLVI, M. N., CHATURVEDI, K., GANGULY, K., SHUKLA, S. S., NADAGOUDA, M. N., AMINABHAVI, T. M. - Polymeric micelles: Basic research to clinical practice. *Int J Pharm*, Vol. 532. n.º 1 (2017) 249-268.
- EISENSTEIN, A., GONZALEZ, E. C., RAGHUNATHAN, R., XU, X., WU, M., MCLEAN, E. O., MCGEE, J., RYU, B., ALANI, R. M. - Emerging Biomarkers in Cutaneous Melanoma. *Mol Diagn Ther*. Vol. 22. n.º 2 (2018) 203-218.
- ELLERHORST, J. A., GREENE, V. R., EKMEKCIOGLU, S., WARNEKE, C. L., JOHNSON, M. M., COOKE, C. P., WANG, L. E., PRIETO, V. G., GERSHENWALD, J. E., WEI, Q., GRIMM, E. A. - Clinical correlates of NRAS and BRAF mutations in primary human melanoma. *Clin Cancer Res*, Vol. 17. n.º 2 (2011) 229-35.
- ERDEI, E., TORRES, S. M. - A new understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*, Vol. 10. n.º 11 (2010) 1811-23.
- FIDRUS, E., UJHELYI, Z., FEHER, P., HEGEDUS, C., JANKA, E. A., PARAGH, G., VASAS, G., BACSKAY, I., REMENYIK, E. - Silymarin: Friend or Foe of UV Exposed Keratinocytes? *Molecules*, Vol. 24. n.º 9 (2019).
- FINK, C., HAENSSLE, H. A. - Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Skin Res Technol*. Vol. 23. n.º 3 (2017) 261-271.
- FRANKLIN, C., LIVINGSTONE, E., ROESCH, A., SCHILLING, B., SCHADENDORF, D. - Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur J Surg Oncol*, Vol. 43. n.º 3 (2017) 604-611.
- GHASEMIYEH, P., MOHAMMADI-SAMANI, S. - Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. *Res Pharm Sci*, Vol. 13. n.º 4 (2018) 288-303.
- GOLDINGER, S. M., MURER, C., STIEGER, P., DUMMER, R. - Targeted therapy in melanoma - the role of BRAF, RAS and KIT mutations. *EJC Suppl*, Vol. 11. n.º 2 (2013) 92-6.
- GOODMAN, S. L., PICARD, M. - Integrins as therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci*, Vol. 33. n.º 7 (2012) 405-12.

- JOSE, A., LABALA, S., NINAVE, K. M., GADE, S. K., VENUGANTI, V. V. K. - Effective Skin Cancer Treatment by Topical Co-delivery of Curcumin and STAT3 siRNA Using Cationic Liposomes. *AAPS PharmSciTech*. Vol. 19. n.º 1 (2018) 166-175.
- KARAGIANNIS, P., FITTALL, M., KARAGIANNIS, S. N. - Evaluating biomarkers in melanoma. *Front Oncol*, Vol. 4. (2014) 383.
- KARIMI, M., BAHRAMI, S., RAVARI, S. B., ZANGABAD, P. S., MIRSHEKARI, H., BOZORGOMID, M., SHAHREZA, S., SORI, M., HAMBLIN, M. R. - Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, Vol. 13. n.º 11 (2016) 1609-1623.
- KILIC, S., UNSAL, A. A., CHUNG, S. Y., SAMARRAI, R., KILIC, S. S., BAREDES, S., ELOY, J. A. - Geographic region: Does it matter in cutaneous melanoma of the head and neck? *Laryngoscope*, Vol. 127. n.º 12 (2017) 2763-2769.
- KOZOVSKA, Z., GABRISOVA, V., KUCEROVA, L. - Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma*. Vol. 63. n.º 4 (2016) 510-7.
- KUNNUMAKKARA, A. B., BORDOLOI, D., HARSHA, C., BANIK, K., GUPTA, S. C., AGGARWAL, B. B. - Curcumin mediates anticancer effects by modulating multiple cell signaling pathways. *Clin Sci (Lond)*, Vol. 131. n.º 15 (2017) 1781-1799.
- LEONARDI, G. C., FALZONE, L., SALEMI, R., ZANGHI, A., SPANDIDOS, D. A., MCCUBREY, J. A., CANDIDO, S., LIBRA, M. - Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *Int J Oncol*, Vol. 52. n.º 4 (2018) 1071-1080.
- LI, L. - Regulatory mechanisms and clinical perspectives of miR-34a in cancer. *J Cancer Res Ther*, Vol. 10. n.º 4 (2014) 805-10.
- LIU, D., LIU, Z., WANG, L., ZHANG, C., ZHANG, N. - Nanostructured lipid carriers as novel carrier for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids Surf B Biointerfaces*, Vol. 85. n.º 2 (2011) 262-9.
- LIU, W., ZHAI, Y., HENG, X., CHE, F. Y., CHEN, W., SUN, D., ZHAI, G. - Oral bioavailability of curcumin: problems and advancements. *J Drug Target*, Vol. 24. n.º 8 (2016) 694-702.

- LOCH-NECKEL, G., SANTOS-BUBNIAK, L., MAZZARINO, L., JACQUES, A. V., MOCCELIN, B., SANTOS-SILVA, M. C., LEMOS-SENNA, E. - Orally Administered Chitosan-Coated Polycaprolactone Nanoparticles Containing Curcumin Attenuate Metastatic Melanoma in the Lungs. *J Pharm Sci*, Vol. 104. n.º 10 (2015) 3524-34.
- MACKIEWICZ, J., MACKIEWICZ, A. - BRAF and MEK inhibitors in the era of immunotherapy in melanoma patients. *Contemp Oncol (Pozn)*, Vol. 22. n.º 1A (2018) 68-72.
- MADANI, S. Y., NADERI, N., DISSANAYAKE, O., TAN, A., SEIFALIAN, A. M. - A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools. *Int J Nanomedicine*. Vol. 6. (2011) 2963-79.
- MAKADIA, H. K., SIEGEL, S. J. - Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, Vol. 3. n.º 3 (2011) 1377-1397.
- MARKMAN, J. L., REKECHENETSKIY, A., HOLLER, E., LJUBIMOVA, J. Y. - Nanomedicine therapeutic approaches to overcome cancer drug resistance. *Adv Drug Deliv Rev*, Vol. 65. n.º 13-14 (2013) 1866-79.
- MARTINCIC, M., TOBIAS, G. - Filled carbon nanotubes in biomedical imaging and drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*, Vol. 12. n.º 4 (2015) 563-81.
- MISHRA, H., MISHRA, P. K., EKIELSKI, A., JAGGI, M., IQBAL, Z., TALEGAONKAR, S. - Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. *J Cancer Res Clin Oncol*, Vol. 144. n.º 12 (2018) 2283-2302.
- MONGE-FUENTES, V., MUEHLMANN, L. A., DE AZEVEDO, R. B. - Perspectives on the application of nanotechnology in photodynamic therapy for the treatment of melanoma. *Nano Rev*, Vol. 5. (2014).
- MUNDRA, V., LI, W., MAHATO, R. I. - Nanoparticle-mediated drug delivery for treating melanoma. *Nanomedicine (Lond)*, Vol. 10. n.º 16 (2015) 2613-33.
- NAJJAR, Y. G., FINKE, J. H. - Clinical perspectives on targeting of myeloid derived suppressor cells in the treatment of cancer. *Front Oncol*, Vol. 3. (2013) 49.

- NASERI, N., VALIZADEH, H., ZAKERI-MILANI, P. - Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Structure, Preparation and Application. *Adv Pharm Bull*, Vol. 5. n.º 3 (2015) 305-13.
- NAVES, L. B., DHAND, C., VENUGOPAL, J. R., RAJAMANI, L., RAMAKRISHNA, S., ALMEIDA, L. - Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. *Prog Biomater*, Vol. 6. n.º 1-2 (2017) 13-26.
- NIKOLAOU, V., STRATIGOS, A. J. - Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol*. Vol. 170. n.º 1 (2014) 11-9.
- O'REILLY, A., LARKIN, J. - Checkpoint inhibitors in advanced melanoma: effect on the field of immunotherapy. *Expert Rev Anticancer Ther*, Vol. 17. n.º 7 (2017) 647-655.
- PALUNCIC, J., KOVACEVIC, Z., JANSSON, P. J., KALINOWSKI, D., MERLOT, A. M., HUANG, M. L., LOK, H. C., SAHNI, S., LANE, D. J., RICHARDSON, D. R. - Roads to melanoma: Key pathways and emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1863. n.º 4 (2016) 770-84.
- PAUTU, V., LEONETTI, D., LEPELTIER, E., CLERE, N., PASSIRANI, C. - Nanomedicine as a potent strategy in melanoma tumor microenvironment. *Pharmacol Res*, Vol. 126. (2017) 31-53.
- PUGAZHENDHI, A., EDISON, T., KARUPPUSAMY, I., KATHIRVEL, B. - Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. *Int J Pharm*, Vol. 539. n.º 1-2 (2018) 104-111.
- RASTRELLI, M., TROPEA, S., ROSSI, C. R., ALAIBAC, M. - Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo*, Vol. 28. n.º 6 (2014) 1005-11.
- RIGEL, D. S., RUSSAK, J., FRIEDMAN, R. - The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin*, Vol. 60. n.º 5 (2010) 301-16.
- RIGON, R. B., OYAFUSO, M. H., FUJIMURA, A. T., GONCALEZ, M. L., DO PRADO, A. H., GREMIAO, M. P., CHORILLI, M. - Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Melanoma Antitumoral Therapy: A Review. *Biomed Res Int*, Vol. 2015. (2015) 841817.

- RODRIGUEZ-CERDEIRA, C., CARNERO GREGORIO, M., LOPEZ-BARCENAS, A., SANCHEZ-BLANCO, E., SANCHEZ-BLANCO, B., FABBROCINI, G., BARDHI, B., SINANI, A., GUZMAN, R. A. - Advances in Immunotherapy for Melanoma: A Comprehensive Review. *Mediators Inflamm*, Vol. 2017. (2017) 3264217.
- ROSENBERG, S. A. - IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. Vol. 192. n.º 12 (2014) 5451-8.
- SALATIN, S., MALEKI DIZAJ, S., YARI KHOSROUSHAHI, A. - Effect of the surface modification, size, and shape on cellular uptake of nanoparticles. *Cell Biol Int*, Vol. 39. n.º 8 (2015) 881-90.
- SAMPLE, A., HE, Y. Y. - Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, Vol. 34. n.º 1 (2018). p. 13-24.
- SHAIN, A. H., BASTIAN, B. C. - From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer*. Vol. 16. n.º 6 (2016) 345-58.
- SHANNAN, B., PEREGO, M., SOMASUNDARAM, R., HERLYN, M. - Heterogeneity in Melanoma. *Cancer Treat Res*, Vol. 167. (2016) 1-15.
- SHI, S., HAN, L., DENG, L., ZHANG, Y., SHEN, H., GONG, T., ZHANG, Z., SUN, X. - Dual drugs (microRNA-34a and paclitaxel)-loaded functional solid lipid nanoparticles for synergistic cancer cell suppression. *J Control Release*, Vol. 194. (2014) 228-37.
- SIMÕES, M. C. F., SOUSA, J. J. S., PAIS, Aacc - Skin cancer and new treatment perspectives: a review. *Cancer Lett*, Vol. 357. n.º 1 (2015) 8-42.
- SIU, K. S., CHEN, D., ZHENG, X., ZHANG, X., JOHNSTON, N., LIU, Y., YUAN, K., KOROPATNICK, J., GILLIES, E. R., MIN, W. P. - Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma. *Biomaterials*, Vol. 35. n.º 10 (2014) 3435-42.
- TARHINI, A. A., GOGAS, H., KIRKWOOD, J. M. - IFN-alpha in the treatment of melanoma. *J Immunol*, Vol. 189. n.º 8 (2012) 3789-93.
- TM, M. Ways, LAU, W. M., KHUTORYANSKIY, V. V. - Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers (Basel)*, Vol. 10. n.º 3 (2018).

- TOY, R., PEIRIS, P. M., GHAGHADA, K. B., KARATHANASIS, E. - Shaping cancer nanomedicine: the effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, Vol. 9. n.º 1 (2014) 121-34.
- VALLONE, M. G., TELL-MARTI, G., POTRONY, M., REBOLLO-MORELL, A., BADENAS, C., PUIG-BUTILLE, J. A., GIMENEZ-XAVIER, P., CARRERA, C., MALVEHY, J., PUIG, S. - Melanocortin 1 receptor (MC1R) polymorphisms' influence on size and dermoscopic features of nevi. *Pigment Cell Melanoma Res*, Vol. 31. n.º 1 (2018) 39-50.
- VERGA, E., CHOCHAN, B., VERDOLINI, R. - Malignant Melanoma Treated with Topical Imiquimod: A Bespoke Treatment That Spared the Amputation. *Case Rep Dermatol*, Vol. 11. n.º 1 (2019) 1-6.
- VINES, J. B., YOON, J. H., RYU, N. E., LIM, D. J., PARK, H. - Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. *Front Chem*, Vol. 7. (2019) 167.
- WADHWA, S., GARG, V., GULATI, M., KAPOOR, B., SINGH, S. K., MITTAL, N. - Nanovesicles for Nanomedicine: Theory and Practices. *Methods Mol Biol*, Vol. 2000. (2019) 1-17.
- WANG, B., LIU, X., TENG, Y., YU, T., CHEN, J., HU, Y., LIU, N., ZHANG, L., SHEN, Y. - Improving anti-melanoma effect of curcumin by biodegradable nanoparticles. *Oncotarget*, Vol. 8. n.º 65 (2017) 108624-108642.
- WEINSTEIN, D., LEININGER, J., HAMBY, C., SAFAI, B. - Diagnostic and prognostic biomarkers in melanoma. *J Clin Aesthet Dermatol*, Vol. 7. n.º 6 (2014) 13-24.
- WICKI, A., WITZIGMANN, D., BALASUBRAMANIAN, V., HUWYLER, J. - Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. Vol. 200. (2015) 138-57.
- YAN, D., SHERMAN, J. H., KEIDAR, M. - Cold atmospheric plasma, a novel promising anti-cancer treatment modality. *Oncotarget*, Vol. 8. n.º 9 (2017) 15977-15995.
- YANAMALA, N., KAGAN, V. E., SHVEDOVA, A. A. - Molecular modeling in structural nano-toxicology: interactions of nano-particles with nano-machinery of cells. *Adv Drug Deliv Rev*, Vol. 65. n.º 15 (2013) 2070-7.

- YOKOYAMA, M. - Polymeric micelles as drug carriers: their lights and shadows. *J Drug Target*, Vol. 22. n.º 7 (2014) 576-83.
- YU, B., WANG, Y., YU, X., ZHANG, H., ZHU, J., WANG, C., CHEN, F., LIU, C., WANG, J., ZHU, H. - Cuprous oxide nanoparticle-inhibited melanoma progress by targeting melanoma stem cells. *Int J Nanomedicine*. Vol. 12. (2017) 2553-2567.
- YU, X., DU, L., LI, Y., FU, G., JIN, Y. - Improved anti-melanoma effect of a transdermal mitoxantrone ethosome gel. *Biomed Pharmacother*, Vol. 73. (2015) 6-11.
- ZHANG, K., TANG, X., ZHANG, J., LU, W., LIN, X., ZHANG, Y., TIAN, B., YANG, H., HE, H. - PEG-PLGA copolymers: their structure and structure-influenced drug delivery applications. *J Control Release*, Vol. 183. (2014) 77-86.
- ZHAO, G., HAN, X., CHENG, W., NI, J., ZHANG, Y., LIN, J., SONG, Z. - Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. *Oncol Rep*, Vol. 37. n.º 4 (2017) 2277-2285.
- ZHU, L., CHEN, L. - Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy. *Cell Mol Biol Lett*, Vol. 24. (2019) 40.

6 | Annexs

Annex I. Advantages and disadvantages of distinct nanosystems used for cutaneous melanoma (CM) therapy.

Nanosystems	Advantage (s)	Disadvantage (s)	References
Nanoemulsions	<ul style="list-style-type: none"> - Small droplets size; - Increases the rate of absorption; - Improved bioavailability of encapsulated materials. 	<ul style="list-style-type: none"> - Use of a large concentration of surfactant necessary for stabilizing the nanodroplets. 	(DALMOLIN and LOPEZ, 2018)
Liposomes	<ul style="list-style-type: none"> - Biodegradability; - Both lipophilic and hydrophilic molecules can be encapsulated. 	<ul style="list-style-type: none"> - High-energy sonication can cause degradation of phospholipids. 	(BRYs <i>et al.</i> , 2016)
Carbon nanotubes	<ul style="list-style-type: none"> - High photostability; - Both biomedical contrast agents and drugs can be encapsulated. 	<ul style="list-style-type: none"> - More research required to evaluate mass production; - Expensive to produce. 	(MADANI <i>et al.</i> , 2011); (MARTINCIC and TOBIAS, 2015)
Bovine serum albumin nanoparticles	<ul style="list-style-type: none"> - Low immunogenicity and nontoxicity; - Easy preparation; - Non-dependence on use of surfactants. 	<ul style="list-style-type: none"> - Potential toxicity from dose dumping. 	(CAMARGO <i>et al.</i> , 2018); (KARIMI <i>et al.</i> , 2016)
Solid lipid nanoparticles	<ul style="list-style-type: none"> - More than one drug can be incorporated; - Biocompatibility and biodegradability; - Possibility of controlled drug release. 	<ul style="list-style-type: none"> - Low drug loading efficiency due to perfect crystalline structure of the solid lipid; - Possibility of drug expulsion due to the crystallization during the storage conditions. 	(SHI <i>et al.</i> , 2014); (GHASEMIYEH and MOHAMMADI-SAMANI, 2018); (NASERI <i>et al.</i> , 2015)
Nanostructured lipid carriers	<ul style="list-style-type: none"> - More controllable release profiles compared to solid lipid nanoparticles; - Minimized drug expulsion during storage and improved stability and capacity loading, in comparison to solid lipid nanoparticles. 	<ul style="list-style-type: none"> - Irritative and sensitizing action of some surfactants. 	(LIU <i>et al.</i> , 2011); (GHASEMIYEH and MOHAMMADI-SAMANI, 2018); (NASERI <i>et al.</i> , 2015)
Micelles	<ul style="list-style-type: none"> - Easy preparation and good stability; - Protection of encapsulated substances from degradation and metabolism. 	<ul style="list-style-type: none"> - Risk of disintegration after administration; - More difficult to selectively target cancer cells. 	(DESHMUKH <i>et al.</i> , 2017); (YOKOYAMA, 2014)

Gold nanoparticles	<ul style="list-style-type: none"> - Promising candidates for cell imaging; - Reported to be antioxidant. 	<ul style="list-style-type: none"> - The molecular interactions with their target cells remain largely unexplored. 	(ALBERTINI <i>et al.</i> , 2019)
Copper nanoparticles	<ul style="list-style-type: none"> - Excellent electrical and thermal conductivities; - Can be manufactured using numerous methods. 	<ul style="list-style-type: none"> - Promising candidates for cell imaging. 	(YU <i>et al.</i> , 2017)
Chitosan-coated nanoparticles	<ul style="list-style-type: none"> - High biocompatibility and biodegradability; - Mucoadhesive properties. 	<ul style="list-style-type: none"> - Presence of impurities, metals and other inorganics, proteins, pyrogenic and endotoxic agents. 	(LOCH-NECKEL <i>et al.</i> , 2015); (BELLICH <i>et al.</i> , 2016)

Annex 2. *In vitro* and *in vivo* studies concerning the administration of nanosystems towards an effective cutaneous melanoma (CM) therapy.

Route of administration	Nanosystem	Drug (s)	Particle size (nm)	PDI	ZP (mV)	EE (%)	DL (%)	Cellular model	<i>In vitro</i> results	Animal model	<i>In vivo</i> results	References
Topical	Nanoemulsion	ZnPc	173.0±0.0	0.2	+43.0±0.0	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	- Melanoma-bearing C57BL/6 female mice model	- The nanosystem reached the tumor by iontophoresis.	(DALMOLIN and LOPEZ, 2018)
	Liposomes	Curcumin + STAT3 siRNA	142.4 ± 5.2	0.2	+42.8 ± 5.0	86.8 ± 6.0	n.r.	B16F10 cells	- Co-delivery inhibited the growth of B16F10 mouse melanoma cells.	- Melanoma-bearing C57BL/6 mice model	- Co-administration significantly inhibited the tumor progression as measured by tumor volume and tumor weight.	(JOSE et al., 2018)
	SWCNTs	BRAF siRNA	n.r.	n.r.	strongly positive	n.r.	n.r.	B16F10 cells	- CNTs successfully delivered siRNA into B16F10 cells, resulting in downregulation of BRAF	- B16F10 melanoma-bearing C57BL/6 murine model	- Significant uptake and gene silencing in the tumor tissue with significant attenuation of tumor growth.	(SIU et al., 2014)
Intraperitoneal	BSA NPs	Curcumin	150.0 ± 7.0	0.2	-32.0 ± 2.0	45.0 ± 7.0	n.r.	B16F10 cells	- Curcumin-loaded BSA NPs were less cytotoxic in B16F10 melanoma cells than free curcumin.	- C57BL/6/j murine melanoma model	- Curcumin-loaded BSA NPs were more effective than free curcumin, as assessed by survival rates and tumor volumes.	(CAMARGO et al., 2018)
Intravenous	SLNs	microRNA-34a + paclitaxel	218.2±0.0	n.r.	+45.1 ± 2.9	95.1±0.8 and 93.1±0.7 for the microRNA-34a and paclitaxel, respectively	1.8±0.2nmol RNA/mg lipids and 1.8±0.0% for the microRNA-34a and paclitaxel, respectively	B16F10-CD44+ cells	- Increased uptake by B16F10-CD44+ cells and higher cell death than the stand-alone preparations.	- Mice xenografted with CD44 antigen-expressing B16F10 cells:	- Enhanced anti-cancer efficiency by miR-34a activity regulating CD44+ expression, accompanied by the toxicity of PTX to all of the cancer cells.	(SHI et al., 2014)
	NLCs	DTX	193.5±5.0	n.r.	-33.2±1.2	89.7±0.9	4.5±0.2%	B16F10 cells	- DTX-NLC showed higher cytotoxicity against B16F10 cells compared with free DTX.	- B16F10 melanoma-bearing mice model	- DTX-NLC reduced side effects and improved antimelanoma efficacy compared to free DTX.	(LIU et al., 2011)

Intravenous	Polymeric micelles	Curcumin	34.5±0.0	n.r.	-2.3±0.0	98.8±0.0	10.0%	BI6F10 cells	- Micelles presented more cytotoxicity in BI6F10 cells than free curcumin.	- BI6F10 melanoma-bearing mice model	- Significant anti-melanoma effects (e.g. inhibited tumor neovascularization).	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
	Gold NPs	Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-NH ₂ (GRGDG-NH ₂) pentapeptide ^{e*}	37.1 ± 2.5	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	BI6F10, U87 and 9L cells	- BI6F10 and U87 cells expressed much higher levels of αvβ3 integrin compared to 9L cell line.	- BI6F10 subcutaneous and intracranial model	- BI6F10 subcutaneous model: 2h post-injection, GRGDG-AuNPs accumulation in the tumor was 3.7 fold higher than AuNPs and 1.2 fold higher than PEG-AuNPs; - BI6F10 intracranial model: 2h post-injection, GRGDG-AuNPs accumulated in the brain 1.5-fold higher than AuNPs and 5-fold higher than PEG-AuNPs.	(ALBERTINI <i>et al.</i> , 2019)
Intradermal	Nanoemulsion	Silymarin	25.5±0.0	0.2	n.r.	n.r.	n.r.	G-361 cells	- ROS and RNS, melanoma specific markers, caspases and PARP-1 levels showed damage in G-361 human melanoma cells.	- G-361 human melanoma cells-xenografted nude mice model:	- Silymarin nanoemulsion and CAP co-treatment decreased the tumor volume and weight.	(ADHIKARI <i>et al.</i> , 2019)
	CONPs	n.a.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	A375 and WM266-4 cells	- CONPs induced apoptosis of melanoma stem cells in A375 and WM266-4 melanoma cell lines.	- A375 melanoma-bearing NOD-SCID mice model	- CONPs suppressed melanoma growth, due to SOX10 and MITF down-regulation.	(YU <i>et al.</i> , 2017)
Oral	Poly (ε-caprolactone) NPs	Curcumin	189.3 ± 1.4	0.1	+32.7 ± 0.4	98.0±0.0	n.r.	BI6F10 cells	- Curcumin-loaded CCNPs inhibited the growth and proliferation of BI6F10 cells.	- Lung cancer-bearing C57BL/6 female mice model	- Curcumin-loaded CCNPs were more effective in reducing the number of lung tumor nodules than free curcumin.	(LOCH-NECKEL <i>et al.</i> , 2015)

Abbreviations: n.r. - not reported; n.a. - not applicable; BSA - Bovine serum albumin; CAP - Cold atmospheric plasma; c-MET - c-MET - Hepatocyte Growth Factor Receptor; CNT - Carbon nanotube; CONP - Copper nanoparticle; DL - Drug loading; DTX - Docetaxel; EE - Encapsulation efficiency; EMT - Epithelial-mesenchymal transition; NLC - Nanostructured lipid carrier; NOD-SCID - Nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency; NP - nanoparticle; PARP-1 - Poly ADP-ribose polymerase 1; PDI - Polydispersity index; PTX - Paclitaxel; RNS - Reactive nitrogen species; ROS - Reactive oxygen species; SLN - Solid lipid nanocarrier; SWCNT - Single-walled carbon nanotubes; ZnPc - Zinc phthalocyanine; ZP - Zeta potential.

* Surface functionalization with the Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-NH₂ (GRGDG-NH₂) pentapeptide to target αvβ3 integrin.