

Manuel Sampaio Soto-Mayor Negrão

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada
“Development and Characterization of Chitosan-Iminothiolane Modified
Porous Silicon Nanoparticles for Oral Delivery of Curcumin”

Referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Dra. Ana Isabel Rebelo,
e Monografia sob orientação do Professor Doutor António Ribeiro e do Professor Doutor Hélder Santos,
apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Manuel Sampaio Soto-Mayor Negrão

Relatórios de Estágio sob a orientação da Dra. Ana Isabel Rebelo, e Monografia intitulada “Development and Characterization of Chitosan-lminothiolane Modified Porous Silicon Nanoparticles for Oral Delivery of Curcumin” sob a orientação do Professor Doutor António Ribeiro e do Professor Doutor Hélder Santos referentes à Unidade Curricular “Estágio”, e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Manuel Sampaio Soto-Mayor Negrão, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011144552, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Development and Characterization of Chitosan-Iminothiolane Modified Porous Silicon Nanoparticles for Oral Delivery of Curcumin” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular 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, 4 de setembro de 2018.

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname, is written over a horizontal line.

(Manuel Sampaio Soto-Mayor Negrão)

Agradecimentos

Os meus mais sinceros agradecimentos,

Ao Professor Doutor Hélder Santos, à Doutora Neha Shrestha, ao Doutor Dongfei Liu, ao Doutor Vimalkumar Balasubramanian, ao Doutor Ermei Mäkilä, à Dra. Flávia Fortuna, à Dra. Alexandra Correia, e ao Dr. João Martins pela oportunidade de colaborar num grupo de investigação de excelência, e pelo apoio constante, paciência, motivação e conhecimento transmitido.

À Farmácia Estádio na pessoa da Dra. Ana Isabel Costa Neves Rebelo por poder vivenciar o valor do Farmacêutico Comunitário.

Ao INFARMED, I.P. e equipa ímpar da Direção de Avaliação de Medicamentos, por ter despoletado em mim o interesse pela área regulamentar e institucional.

Ao Professor Doutor António José Ribeiro, pelo apoio prestado ao longo do curso e estágios nacionais e internacionais.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra pelos conhecimentos e oportunidades que proporcionaram um percurso académico sem igual.

INDÍCE

PARTE I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Lista de Abreviaturas.....	7
1. Introdução	8
2. Enquadramento da Farmácia Estádio.....	8
3. Análise SWOT.....	9
3.1 Pontos Fortes.....	9
3.1.1 Espaço:.....	9
3.1.2 Equipa Técnica.....	10
3.1.3 Plano de estágio.....	10
3.1.4 Certificação	11
3.1.5 <i>Kaizen</i>	11
3.2 Pontos Fracos	12
3.2.1 Privacidade no atendimento.....	12
3.2.2 Estacionamento	12
3.3 Oportunidades.....	13
3.3.1 Localização	13
3.3.2 <i>Sifarma 2000</i> ®.....	13
3.3.3 Valormed.....	13
3.4 Ameaças.....	14
3.4.1 Outros Estabelecimentos de Venda de MNSRM.....	14
3.4.2 Desconhecimento relativamente aos Medicamentos Genéricos	14
4. Caso Clínico	15
5. Considerações Finais.....	16
6. Referências Bibliográficas	17

PARTE II - Relatório de Estágio na Direção de Avaliação de Medicamentos do INFARMED I.P.

Lista de Abreviaturas.....	20
1. Introdução	21
2. INFARMED, I.P. – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde 22	
3. ANÁLISE SWOT	23
3.1 Pontos fortes.....	23
3.1.1 Planeamento e objetivo do estágio	23
3.1.2 Equipa técnica.....	24

3.1.3	Visita à Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ).....	25
3.1.4	Assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos (CAM).....	25
3.2	Pontos fracos	25
3.2.1	Local de trabalho.....	25
3.2.2	Curta duração do estágio.....	26
3.3	Oportunidades	26
3.3.1	Contato diário com a Indústria Farmacêutica	26
3.3.2	Entidade de reputação quer a nível nacional quer a nível Internacional.....	26
3.4	Ameaças	27
3.4.1	Incerteza causada pela possível deslocação da Instituição para o Porto.....	27
4.	Considerações Finais	28
5.	Referências Bibliográficas	29

PARTE III - Development and Characterization of Chitosan-Iminothiolane Modified Porous Silicon Nanoparticles for Oral Delivery of Curcumin

List of Abbreviations.....	31
Abstract	32
Resumo.....	33
1. Introduction	34
2. Methods and Materials	37
2.1 Preparation and characterization of porous silicon (PSi) nanoparticles (NPs).....	37
2.2 Transmission electron microscopy study	38
2.3 Drug loading.....	38
2.4 Solvent choice	39
2.5 Cellular viability studies.....	39
2.6 Cellular interaction study.....	39
3. Results and Discussion	40
3.1. Preparation, characterization and functionalization of PSiNPs.....	40
3.2. Solvent Choice	43
3.3. Drug loading studies.....	44
3.4. In vitro cell viability study.....	44
3.5. Interaction study	45
4. Conclusions	47
References	48

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas, orientado pela Dra. Ana Isabel Costa Neves Rebelo e apresentado à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Lista de Abreviaturas

ANF – Associação Nacional das Farmácias

APCER – Associação Portuguesa de Certificação

DCI – Denominação Comum Internacional

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

INFARMED – Autoridade Nacional Do Medicamento e Produtos de Saúde I.P

MNSRM – Medicamento Não Sujeito a Receita Médica

OGF – Organização e Gestão Farmacêutica

SGQ – Sistema de Gestão de Qualidade

SWOT – Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats

1. Introdução

O Estágio Curricular em Farmácia Comunitária representa o culminar de toda a formação académica, continuando a ser uma peça-chave indispensável no percurso de um estudante de Ciências Farmacêuticas.

Como espectável, este estágio é uma etapa enriquecedora que permite a consolidação e aplicação de toda a aprendizagem teórica num dos seus contextos reais, neste caso num ambiente onde o papel do farmacêutico continua a ser essencial. Com o decorrer dos anos verificou-se que o papel profissional do farmacêutico, em simultâneo com as outras classes profissionais, também percorreu a seu próprio progresso passando a ter como objetivo principal a pessoa do utente.

Atualmente, o farmacêutico, mais do que um especialista do medicamento, representa um agente de saúde pública, ao qual compete contribuir para a salvaguarda e promoção para a saúde. [1]

A farmácia continua a ser um local de preferência para esclarecer questões relacionadas com a saúde. Tendo em conta que o farmacêutico é um profissional de saúde próximo e bastante acessível à população, um estágio curricular numa Farmácia Comunitária representa uma oportunidade ímpar para a evolução enquanto futuros profissionais de saúde, sendo uma ponte para o futuro mercado de trabalho.

O presente relatório expõe uma compilação dos conhecimentos adquiridos e das atividades realizadas, através de uma análise SWOT (Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats), de modo a salientar os pontos fortes e fracos, as oportunidades e as ameaças ao estágio e à própria farmácia.

O estágio decorreu do dia 4 de setembro de 2017 a dia 22 de novembro do mesmo ano, na Farmácia Estádio em Coimbra, sob a orientação da Sra. Dra. Ana Isabel Costa Neves Rebelo.

2. Enquadramento da Farmácia Estádio

A Farmácia Estádio localiza-se na Rua D. João III, nº11, no Estádio Cidade de Coimbra. É propriedade da Dr^a Ana Isabel Costa Neves Rebelo, sendo a diretoria técnica assegurada pela própria.

3. Análise SWOT

A análise SWOT é uma ferramenta de gestão vastamente utilizada que permite a elaboração de diagnósticos estratégicos empresariais. É uma análise composta por duas dimensões: a dimensão interna, e a dimensão externa.

Enquanto que a dimensão interna analisa o produto e a empresa, traduzindo-se em situações e decisões que podemos gerir (pontos fortes e pontos fracos); a dimensão externa analisa o meio envolvente e o mercado, incluindo circunstâncias e decisões sob as quais não temos controlo, das quais podemos tirar vantagem ou das quais nos devemos proteger (oportunidades e as ameaças). [2]

3.1 Pontos Fortes

3.1.1 Espaço:

A Farmácia Estádio oferece um espaço bastante amplo o que permite uma exposição variada e organizada de produtos. Esta exposição facilita aos clientes a visualização e escoamento dos novos produtos.

A organização deste tipo de produtos, onde se enquadram os cosméticos, ortopédicos e MNSRM permite uma aplicação dos conhecimentos adquiridos nas disciplinas de OGM e ainda de Marketing Farmacêutico.

O dinamismo exigido na planificação de todo o espaço de atendimento é um imperativo que faz necessariamente com que a farmácia resulte num espaço afável e acolhedor, com ar moderno que advém também da boa iluminação quer natural, quer artificial.

A farmácia dispõe ainda de um laboratório para a elaboração de manipulados, sala de reuniões, escritórios, vestiário, cozinha/copa, armazém, instalações sanitárias, e três gabinetes de utente onde são dadas consultas de nutrição e podologia, onde são administradas algumas vacinas e executadas algumas medições (glicémia, colesterol, triglicéridos, tensão arterial), e ainda onde são feitas as trocas de seringas.

3.1.2 Equipa Técnica

A Equipa Técnica foi, sem dúvida, um dos pontos fortes mais relevantes deste estágio. A Farmácia Estádio é composta por uma equipa extraordinária e extremamente competente que, desde o início, deu sempre o apoio necessário. A simpatia, a alegria, a entreatajuda e a disponibilidade em ensinar foram uma constante no dia-a-dia, o que proporcionou uma fácil e célere integração. Para além disso, o facto de haver profissionais que zelam pela competência, rigor e qualidade nas atividades desempenhadas, permite a sustentada melhoria da produtividade no trabalho, como também favorece a criação de relações interpessoais saudáveis e valiosas.

As funções de cada membro da equipa estão bem definidas. Este facto resulta numa agilização do trabalho, uma vez que cada um está ciente das suas responsabilidades. Para além disso, a boa delegação das tarefas dentro da equipa faz com que, em caso de alguma advertência durante o estágio, a resolução de problemas seja feita de um modo fácil e rápido, tornando assim o trabalho mais bem-sucedido.

A possibilidade de aprender observando este constante dinamismo, ajudou a construir uma excelente identidade profissional, e a definir uma ótima atitude perante a profissão.

3.1.3 Plano de estágio

A Farmácia Estádio apresenta um plano de estágio bem estratificado constituído por diferentes etapas. Com o intuito de uma melhor integração na profissão, o estágio começa pela receção e gestão de encomendas. Esta é uma etapa onde se realiza um reconhecimento mais detalhado de como é feito o armazenamento de cada medicamento, e também de como é gerido na plataforma informática *Sifarma 2000*[®]. Esta fase de aprendizagem demonstra-se bastante relevante uma vez que o sucesso e sustentabilidade de uma farmácia dependem, em grande parte, da eficiência das atividades de *BackOffice*.

Para uma aproximação ao conceito de medicamento genérico e a sua abordagem junto dos utentes foi possível o acompanhamento da diretora técnica à delegação da ANF em Coimbra. Aí, foram revelados os números acerca do consumo a nível nacional, das metas a atingir acordadas com o Ministério da Saúde, e ainda alguns métodos de como melhorar a apresentação à população em relação ao genérico e da sua eficácia.

Em seguida o estágio passou a incluir o atendimento ao público. Numa fase mais inicial foram feitas medições de pressão sanguínea, glicémia, colesterol e também de triglicéridos, e numa fase mais avançada passou a decorrer ao balcão, primeiro acompanhado por um farmacêutico, e depois sozinho. Toda esta planificação permite uma maior autonomia na execução das tarefas ao longo do período de estágio.

3.1.4 Certificação

A Farmácia Estádio é uma das escassas farmácias certificadas em Coimbra pela Associação Portuguesa de Certificação (APCER). Através desta, é conseguida a garantia de um Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) segundo a norma NP EN ISO 9001:2015. Não sendo um mero diploma, esta certificação da APCER é uma garantia de que a farmácia é gerida em função de protocolos previamente estabelecidos, fazendo com que seja possível a poupança de recursos e tempo, o que permite alcançar níveis de qualidade superiores.

Assim sendo, a aplicação deste SGQ permite a transmissão aos utentes uma maior segurança no profissionalismo da parte dos colaboradores, sendo também por isso um fator diferenciador em relação a outras farmácias.

A hipótese de trabalhar num SGQ torna-se bastante benéfico para o estágio, pois obriga a trabalhar segundo protocolos estabelecidos, coagindo a uma maior organização das tarefas, o que resulta necessariamente numa aprendizagem em maiores níveis de exigência e rigor.

3.1.5 *Kaizen*

Kaizen é um conceito trazido da cultura japonesa que se decompõe em duas palavras: “*Kai*” e “*zen*” que significa “mudar”, e “melhor” respetivamente. Trata-se de uma filosofia ou de práticas que incidem sobre a melhoria contínua do desempenho em diversos âmbitos. Sempre que executado no sentido de negócio e ao local de trabalho, o *kaizen* origina melhoria contínua das tarefas, envolvendo sempre todos os colaboradores. Igualmente se aplica a processos, como logística e compra. Ao aperfeiçoar atividades e processos padronizados, o *kaizen* tem em vista a extinção do desperdício e consecutivamente o aumento de eficiência. Os quatro pontos essenciais são Triar, Limpar, Disciplinar e Racionalizar. [3]

Na Farmácia Estádio a metodologia *Kaizen* é frequentemente usada. A equipa reúne-se e através dos resultados e preocupações é criada uma discussão tendo em vista a melhoria do funcionamento do estabelecimento.

Através destas reuniões, o *Kaizen* previne os colaboradores de ceder à rotina no dia-a-dia laboral comprometendo a equipa a fazer um diagnóstico constante do desempenho, e conseqüentemente a procurar melhor a execução dos processos diários com vista ao cumprimento das metas da farmácia.

Visto isto o *Kaizen* tem representado um excelente pilar da estratégia competitiva de longo prazo para todo o tipo de instituições.

3.2 Pontos Fracos

3.2.1 Privacidade no atendimento

A Farmácia Estádio é composta por seis balcões de atendimento agrupados dois a dois, o que previne a formação de filas de espera demasiado grandes. Para além disso, esta organização dos balcões pode ser encarada como um ponto forte, uma vez que se torna vantajoso aprender a realizar o atendimento ao público com um colaborador a atender no balcão ao lado. Todavia, este *design* não é de todo o mais vantajoso no que toca à privacidade, uma vez que o utente não fica totalmente à vontade para expor a situação sendo por vezes necessário ter que o deslocar para o gabinete de utente.

3.2.2 Estacionamento

A Farmácia Estádio apresenta uma localização excelente. Apesar disso a deslocação de carro fica condicionada devido ao facto de o estacionamento ser um problema. Em frente à farmácia, a Câmara Municipal de Coimbra permite paragem de viaturas para cargas e descargas. Quanto ao estacionamento é proibido. Assim sendo, os carros estacionados aí estão sujeitos a serem autuados.

A solução para esta situação é o estacionamento subterrâneo. Este estacionamento é gratuito para os utentes da farmácia, todavia, a grande maioria das pessoas desconhece a existência deste, por falta de divulgação.

3.3 Oportunidades

3.3.1 Localização

A Farmácia Estádio situa-se numa das zonas nobres e com densidade residencial elevada. Encontra-se no bairro da Solum, na junta de freguesia Santo António dos Olivais, na cidade de Coimbra, junto ao centro comercial ALMA.

A localização da farmácia é privilegiada devido à proximidade a um vasto número de clínicas de saúde de diferentes especialidades, o que atrai um conjunto muito alargado de utentes. Este fator, para além de aumentar a afluência à farmácia, torna-se uma oportunidade por permitir também o contacto com utentes de diferentes faixas etárias e níveis socioculturais, obrigando a uma rápida adequação do diálogo personalizado a ter com o utente, o que indiretamente possibilitou o desenvolvimento da capacidade de resolução de problemas, uma vez que muitas das ocasiões acabavam por ocorrer em ocasiões de maior número de pessoas para atender.

3.3.2 *Sifarma 2000*[®]

A plataforma de gestão utilizado em 2477 farmácias a nível nacional representa uma ferramenta indispensável para todos os profissionais que trabalham para as farmácias comunitárias. [4]

Este valor, que representa 90% das farmácias, confirma que o *Sifarma 2000*[®] é uma ferramenta que se tornou essencial para a boa gestão garantindo um serviço de qualidade, completo com tecnologias atuais. [4]

A oportunidade de poder aprender e trabalhar com *Sifarma 2000*[®] tornou-se muito importante, pois trata-se de um software que oferece segurança no atendimento e maior cuidado prestado na dispensa do medicamento junto do utente.

3.3.3 Valormed

Com a maior acessibilidade das populações aos medicamentos surgiu também a necessidade de ser criado um sistema de gestão de resíduos que executasse a recolha e o tratamento seguro dos resíduos medicamentosos. Desta necessidade, surgiu em 1999, a *Valormed* que é uma sociedade sem fins lucrativos que resulta de uma colaboração entre indústria farmacêutica, distribuidores e farmácias comunitárias. [5]

Esta iniciativa é de uma oportunidade para as farmácias apelarem juntamente com os seus parceiros e utentes a uma maior consciencialização da responsabilidade ambiental e social que tende a promover para um ambiente mais limpo e uma sociedade mais sustentável.

3.4 Ameaças

3.4.1 Outros Estabelecimentos de Venda de MNSRM

Com a promulgação do Decreto-Lei nº238/2007, de 19 de junho, as farmácias deixaram de ter a exclusividade nas vendas de MNSRM [6]. Assim estes medicamentos passaram a ser possíveis de encontrar à venda em outros estabelecimentos como por exemplo Supermercados, e Bombas de Gasolina. A denominação mais comum é Parafarmácia, mas a venda de MNSRM não é exclusiva a estas.

Esta medida é vista como uma forte ameaça económica ao setor farmacêutico, uma vez que a maior parte destes novos estabelecimentos comerciais consegue alocar o preço dos medicamentos significativamente mais baixo, ganhando vantagem competitiva. Para além disso, esta mudança jurídica promove a desvalorização da profissão farmacêutica, uma vez que nestes espaços não existem farmacêuticos para prestarem um aconselhamento científico e responsável ao utente.

Os medicamentos acabam por ser vendidos sem qualquer tipo de avaliação da situação clínica, sendo, portanto, um incentivo à automedicação irresponsável e danosa, uma vez que estes medicamentos são responsáveis por um número significativo de intoxicações e mortes, que seriam evitáveis pela presença de um farmacêutico.

3.4.2 Desconhecimento relativamente aos Medicamentos Genéricos

A Portaria n.º 1501/2002 permitiu a implementação da prescrição por DCI. Como tal, o farmacêutico passou a ter o dever de perguntar ao utente se tem preferência em algum laboratório em específico no que toca aos seus medicamentos, (medicamento de referência ou genérico) o que permitiu uma maior facilidade de venda de genéricos [5]. Um medicamento genérico possui a mesma substância ativa, dosagem, forma farmacêutica e indicação terapêutica que o medicamento original, tendo sido demonstrada bioequivalência. [7]

Este novo paradigma trouxe uma redução significativa na despesa em medicamentos aos utentes, e também uma redução da despesa em participações ao Erário Público.

Contudo, esta nova realidade ainda é desconhecida para um grande número de pessoas que aparece na farmácia, sendo o desconhecimento do conceito o maior causador de receio na adesão final.

4. Caso Clínico

Durante o estágio curricular um utente dirigiu-se à farmácia e solicitou uma caixa de Imodium Rapid® (comprimidos orodispersíveis, dosagem 2mg). Explicava que queria parar a diarreia que durava já há algum tempo.

Primeiro questionei o utente acerca da duração da diarreia, ao que respondeu que se tratava de uma condição que se prolongava há cerca de uma semana. Posteriormente, questionei-o se acerca da sua febre, tendo o utente respondido que esta variava entre 37,5C° e 38°C.

Habitualmente, a diarreia trata-se uma condição médica de origem viral e autolimitada, sendo que a larga maioria da população, quando tem esta condição, o seu organismo é capaz de repor a homeostasia num curto espaço de tempo. Porventura, quando um utente apresenta diarreia e febre alta para além de 5 dias, ou ainda apresentar fezes com sangue, é essencial encaminhar para um médico, uma vez que esta pode ter origem bacteriana. Nestas situações, torna-se fundamental a toma de antibiótico.

A meu cargo estava o desaconselhamento da toma de Imodium Rapid®, uma vez que este reduzindo a frequência das dejeções, pode tornar-se prejudicial para o utente. Uma vez tratando-se de uma infeção bacteriana, a diminuição da frequência das dejeções leva à retenção das bactérias patogénicas no organismo, causando um possível agravamento da situação clínica do utente. [8]

No entanto, é fulcral nestas situações prevenir a desidratação e também normalizar o intestino, uma vez que a diarreia provoca a escassez de eletrólitos e fluídos. Assim sendo, recomendei a toma de dois medicamentos: Dioralyte®, um pó para solução oral constituído por glicose e sais, que permite corrigir a perda de eletrólitos e fluídos, e ainda cápsulas de UL-250®, um probiótico que auxilia na reposição da flora intestinal.

Relativamente à posologia do Dioralyte® e UL-250® esta é uma saqueta a cada dejeção, e 3 cápsulas por dia, respetivamente [9, 10]. Para além disso, como medidas não farmacológicas, recomendei o utente, até voltar à normalidade, a ingerir bastantes líquidos e a evitar certo tipo de produtos como alimentos gordurosos, fibras, lacticínios, fritos ou ainda refeições bastante condimentadas.

5. Considerações Finais

As Farmácias Comunitárias são cada vez mais um espaço de singular relevância na sociedade. Esta situação advém da evolução do farmacêutico enquanto profissional de saúde. A mudança de foco para a pessoa do utente ao revés do passado que era exclusivamente a preparação e dispensa de medicamentos faz com que hoje a classe seja composta por profissionais competentes e de confiança.

Contudo, ainda existe um caminho a percorrer na valorização da profissão farmacêutica, sendo que é imprescindível que cada farmacêutico continue a zelar pelo enobrecimento da profissão, procurando a excelência e o sucesso em todas as atividades.

Como estagiário pude constatar a importância que existe na manutenção e a atualização dos conhecimentos técnico-científicos. A correlação entre estes e o melhor serviço de aconselhamento aos utentes é francamente evidente, e como tal torna-se imprescindível na medida em que é a chave para uma maior valorização da classe farmacêutica.

No presente relatório é possível constatar um predomínio dos Pontos Fortes em relação aos Pontos Fracos. Este facto prova que este estágio representou uma ocasião muito proveitosa no percurso do Mestrado de Ciências Farmacêuticas, na medida em que representou uma oportunidade extraordinária de aprendizagem e consolidação de conhecimentos.

Concluindo, resta-me a agradecer uma vez mais à equipa da Farmácia Estádio pela amizade, dedicação, e paciência presente durante todo este estágio curricular.

6. Referências Bibliográficas

1. Ordem dos Farmacêuticos - *Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos* [Acedido a 9 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/file/a/70186154>
2. economias, *Análise SWOT: o que é e para que serve?* [Acedido a 9 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://www.economias.pt/analise-swot-o-que-e-e-para-que-serve/>
3. Kaizen Institute - *O que é Kaizen?* - [Acedido a 9 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://pt.kaizen.com/quem-somos/significado-de-kaizen.html>
4. glintt - *Sifarma 2000*[®] - [Acedido a 21 de agosto de 2018] Disponível na Internet: <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
5. VALORMED – *QUEM SOMOS* - [Acedido a 21 de agosto de 2018] Disponível na Internet: <http://www.valormed.pt/paginas/2/quem-somos/>
6. MINISTÉRIO DA SAÚDE - *Decreto-Lei n.º 238/2007*. Diário da República n.º 116/2007, Série I de 2007-06-19, 2007. [Acedido a 10 de julho de 2018]- Disponível na Internet: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/639284/details/maximized>
7. MINISTÉRIO DA SAÚDE - *Portaria n.º 1501/2002*. Diário da República n.º 287/2002, Série I-B de 2002-12-12, 2002. [Acedido a 10 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/406690/details/normal?q=prescri%C3%A7%C3%A3o+por+DCI+>
8. INFARMED - *Medicamentos Genéricos, Perguntas frequentes*. [Acedido a 10 de julho de 2018] Disponível na Internet: http://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/medicamentos_uso_humano/muh_medicamentos_genericos
9. INFARMED - *RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - Imodium Rapid, 2 mg, comprimido orodispersível*. 2016. [Acedido a 10 de julho de 2018] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=4444&tipo_doc=rcm
10. INFARMED - *RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - UL-250, 250 mg, cápsulas* 2014. [acedido a 10 de julho de 2018] Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=8813&tipo_doc=rcm

11. INFARMED - RESUMO DAS CARACTERÍSTICAS DO MEDICAMENTO - *Dioralyte*, pó para solução oral. 2004. [acedido a 10 de julho de 2018]. Disponível na Internet: http://app7.infarmed.pt/infomed/detalhes.php?med_id=2676&dci=&nome_comer=RGlvcmFseXRI&dosagem=&cnpem=&chnm=&forma_farmac=&atc=&disp=&estado_aim=&pesquisa_titular=&cft=&grupo_produto=&pagina=1

Parte II

Relatório de Estágio na Direção de Avaliação de Medicamentos do INFARMED I.P.

Relatório de Estágio realizado no âmbito do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, apresentado à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Lista de Abreviaturas

CAM – Comissão de Avaliação de Medicamentos

CTD – *Common Technical Document* (Dossier Técnico Comum)

DAM – Direção de Avaliação de Medicamentos

DRHFP – Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais

EAMI – Encontro das Autoridades Competentes de Medicamentos dos Países Ibero-Americanos

EMA – *European Medicines Agency*

EUA – Estados Unidos da América

FARMED – Fórum das Agências Reguladoras dos Países do Espaço Lusófono

FDA – *Food and Drug Administration*

GestProc – Gestão de Processos (aplicação)

GIMED – Gestão de informação de medicamentos (aplicação)

GRCM – Gestão de Resumos de Características do Medicamento (aplicação)

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

MICF – Mestrado Integrado em Ciências farmacêuticas

SMUH-ALTER – Sistemas de gestão de medicamentos de uso humano – submissão eletrónica (plataforma)

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

UAC – Unidade de Avaliação Científica

UEC – Unidade de Ensaio Clínicos

UMM – Unidade de Manutenção do Mercado

I. Introdução

Segundo o Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos, há tantos colégios quantas as especialidades ou grupos de especialidades afins do Farmacêutico [1]. Como tal, e verificando-se que existem mais especialidades para além de farmácia comunitária, este estágio surge no sentido de alargar o espectro de experiências profissionais nas quais o farmacêutico tem um papel decisivo.

A área regulamentar surge no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) na altura da inscrição na faculdade no 4º ano. No segundo semestre deste ano existe uma disciplina de frequência obrigatória de nome 'Assuntos Regulamentares'. Esta disciplina tem uma vertente teórica e teórico-prática onde são objeto de estudo as questões que se relacionam com os vários tipos de registo do medicamento quer a nível nacional, quer a nível europeu. Para além disso, também são objeto de estudo os vários capítulos que fazem parte de um Dossier Técnico Comum [2].

O meu interesse em trabalhar nesta área foi sendo cada vez maior e foi sendo cada vez mais evidente que esta seria fulcral para o meu futuro profissional. Como tal, a possibilidade de poder estagiar numa instituição onde pudesse testar os meus conhecimentos e aprender ainda mais do que foi sendo assimilado ao longo das aulas, certamente seriam uma oportunidade única.

O presente relatório apresenta uma análise SWOT onde são detalhadas os pontos fortes, os pontos fracos, as oportunidades e as ameaças do estágio decorrido no INFARMED I.P.. O estágio, que decorreu de 2 de maio a 31 de julho, teve lugar na Unidade de Manutenção de Mercado (UMM) da Direção de Avaliação de Medicamentos (DAM).

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

Aquando da integração da adesão à Comunidade Económica, Portugal obtinha uma derrogação de cinco anos na aplicação das diretivas comunitárias relacionadas com o medicamento. Em 1993, após a presidência portuguesa da União Europeia no ano anterior, é aprovada em conselho de ministros a formação à altura do Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento. À data era um instituto regulador com autonomia financeira e administrativa. Mais tarde passou a ter um laboratório para comprovação da qualidade dos medicamentos, e toda uma organização capaz de fazer o controlo de todo o ciclo do medicamento [3].

Atualmente, o Infarmed é um instituto regulador com uma forte participação ativa no novo Sistema Europeu do Medicamento e, em 2017, face aos processos geridos pela totalidade dos estados europeus, atingiu o 4º lugar no âmbito dos medicamentos centralizados e o 5º lugar quanto aos medicamentos aprovados por procedimentos de reconhecimento mútuo e descentralizados [4].

A missão do Infarmed hoje, passa por regular e supervisionar os sectores dos medicamentos, dispositivos médicos, produtos cosméticos e de higiene corporal. Inicialmente este envolvimento resumia-se a um abrangimento nacional, tendo progredido para um nível europeu. Atualmente a lista de acordos de colaboração é extensa e ultrapassa a dimensão europeia com a EMA (European Medicines Agency), incluindo países lusófonos como o caso do FARMED (Fórum das Agências Reguladoras dos Países do Espaço Lusófono), países ibero-americanos como a Rede EAMI (Encontro das Autoridades Competentes de Medicamentos dos Países Ibero-Americanos), a FDA (*Food and Drugs Administration*) nos EUA. e ainda de outros países como Marrocos ou China [5].

O Infarmed é constituído por cinco órgãos e doze unidades orgânicas com funções de negócio e de suporte, conforme apresenta o organograma da instituição.

ORGANOGRAMA – INFARMED, I.P.

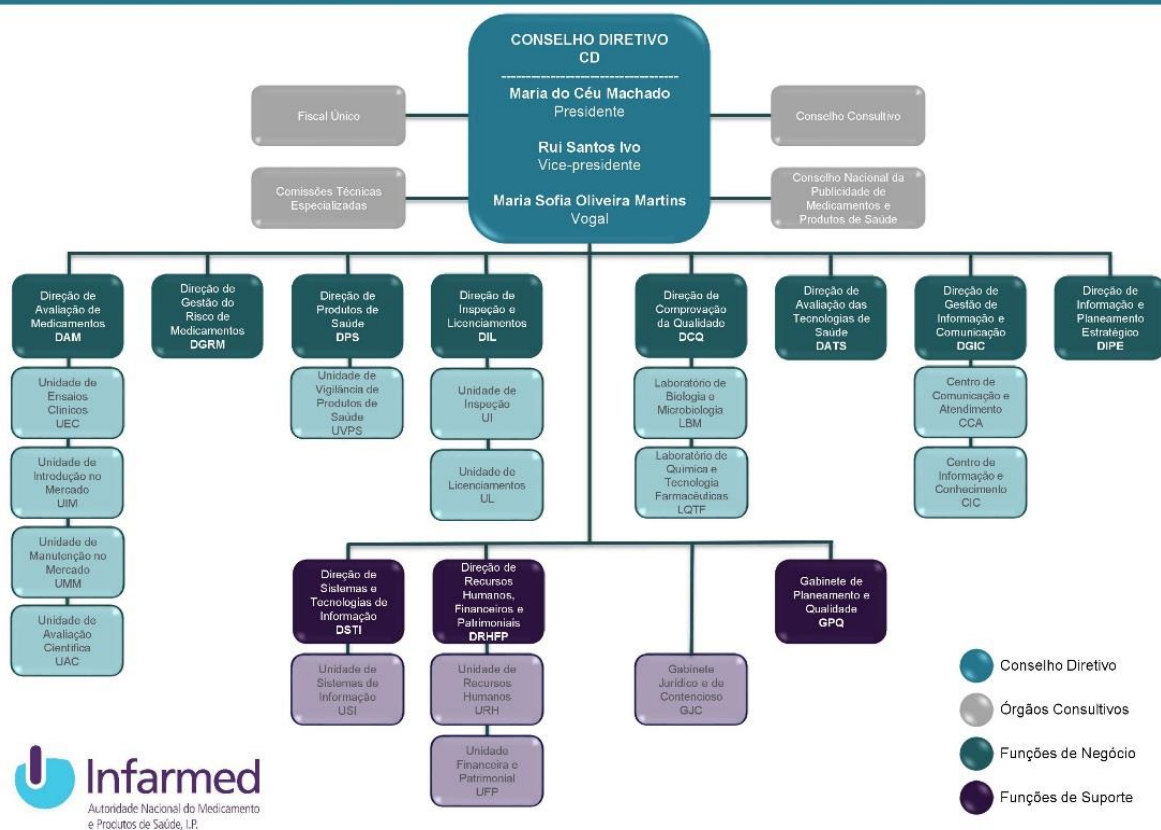


Figura 1 - Organograma INFARMED, I.P.

Disponível em <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/estrutura-e-organizacao> [Acedido a 1 de julho de 2017]

3. ANÁLISE SWOT

3.1 Pontos fortes

3.1.1 Planeamento e objetivo do estágio

O acolhimento dos estagiários no Infarmed constituiu um dos pontos fortes deste estágio. A receção às instalações do Infarmed foi feita por um Técnico Superior, em representação da Direção de Recursos Humanos, Financeiros e Patrimoniais (DRHFP), que proporcionou uma formação inicial de grande relevância. Nela foram-nos transmitidas informações pertinentes sobre o estágio e apresentando de um modo geral a instituição. Durante esta receção, foi atribuído a cada estagiário um e-mail institucional, um número mecanográfico e um Manual de Acolhimento. Terminada a formação de

acolhimento, os estagiários foram encaminhados para os chefes de direção onde iriam fazer o seu estágio.

Sendo este estágio na direção de avaliação do medicamento, a restante formação inicial foi feita por técnicos superiores da DAM que proporcionaram apresentações sobre o funcionamento desta direção, sobre os processos de autorização de introdução no mercado a nível nacional e europeu e ainda sobre renovação e alteração destes processos.

Esta formação já no âmbito da DAM foi bastante elucidativa pois tratou-se de uma revisão sobre as matérias lecionadas na disciplina de Assuntos Regulamentares, e ainda uma introdução para a aprendizagem sobre o trabalho especificamente executado por cada unidade.

Posteriormente, a formação passou a ser individualizada e toda a informação sobre aplicações informáticas como GIMED (Gestão de Informação de Medicamentos), SMUH-ALTER, GestProc e GRCM foi aprendida, tal como toda a gestão dos pedidos de alteração. Os processos de pedido de alteração que foram alvo de execução foram de tipificação IA, IB, e II da categoria C.I.3, C.I.z. e ainda C.I.4. A aprendizagem dependeu de interpretação de decretos-lei, Portarias Nacionais e de Diretivas europeias.

3.1.2 Equipa técnica

O Infarmed é composto por sete direções com funções de negócio. Em todo o Infarmed, a DAM é a direção com mais unidades. Nela estão inseridos a Unidade de Ensaio Clínicos (UEC), a Unidade de Manutenção no Mercado (UMM) e a Unidade de Avaliação Científica (UAC). É nesta direção onde estão alocados o maior número de colaboradores do Infarmed.

Um dos pontos fortes deste estágio foi a forma como foi feita a integração dos estagiários. A disponibilidade, paciência, e dedicação da parte dos colaboradores, permitiram uma evolução das aprendizagens que, com o passar do tempo, permitiu a execução de cada tarefa com mais autonomia, responsabilidade e confiança.

3.1.3 Visita à Direção de Comprovação da Qualidade (DCQ)

No dia 28 de julho o grupo de estagiários visitou a DCQ. Após uma apresentação da Diretora da DCQ sobre as competências da Direção e uma explicação do trabalho desempenhado pela direção, foi feita uma visita guiada à amostroteca e aos dois laboratórios da DCQ, o Laboratório de Química e Tecnologia Farmacêuticas e o Laboratório de Biologia e Microbiologia.

Sendo os laboratórios da DCG reconhecidos não só a nível nacional, como europeu e mundial, considero esta visita um ponto forte do estágio. Além de ter permitido obter uma noção concreta da colaboração entre empresas e o Infarmed, foi fulcral no reconhecimento da importância de um bom relacionamento entre instituições, baseada na comunicação eficaz e focada nos objetivos em comum.

3.1.4 Assistir a uma reunião da Comissão de Avaliação de Medicamentos (CAM)

No dia 30 de julho houve a oportunidade de assistir a uma reunião da CAM. É nestas reuniões quinzenais, que uma equipa multifacetada (composta por avaliadores farmacêuticos, médicos, toxicológicos, entre outros) se reúne, com a função de discutir e tomar posição acerca de pareceres de avaliação da qualidade, eficácia e segurança de medicamentos a ser introduzidos e mantidos no mercado português.

Mais uma vez, pela diversidade de oportunidades dadas ao longo do estágio, de conhecer várias vertentes do trabalho realizado no Infarmed, considero a reunião em causa um dos seus pontos fortes.

3.2 Pontos fracos

3.2.1 Local de trabalho

Apesar da dedicação, disponibilidade, e paciência para o ensino de toda a aprendizagem necessária, o facto de um grupo de estagiários ter sido todo alocado numa mesma sala distante da sala onde os colaboradores da UMM trabalhavam não permitia uma fácil execução das tarefas, levando a um desperdício de tempo para executar alguns tipos de tarefas que poderiam ser facilmente esclarecidos se alguém presente na sala fosse mais experiente. Entre colegas, a ajuda foi também constante, o que colmatava alguma inexperiência por exemplo na gestão dos *softwares* informáticos.

Reforço a ideia que se o local de trabalho pudesse ter sido mais próximo dos gestores de processo, a eficiência poderia ter sido maior.

3.2.2 Curta duração do estágio

O outro ponto menos positivo deste estágio foi a duração do mesmo. Sabendo que para formar um técnico superior para estar apto a trabalhar em plena autonomia no Infarmed são necessários entre 3 a 5 anos, é facilmente verificável que os escassos três meses apenas dão uma mera ideia das tarefas executadas numa Unidade.

Apesar disso, este fator não menospreza o resultado conjunto de todo o estágio.

3.3 Oportunidades

3.3.1 Contato diário com a Indústria Farmacêutica

É frequente durante o estágio efetuar comunicações através do email ou telefone às requerentes de pedidos de alteração.

No decorrer do estágio, pude estar em permanente contacto com as indústrias farmacêuticas que são a grande maioria dos requerentes de pedidos de alteração aos termos de AIM. Por esse motivo, foi possível uma maior assimilação de quem são as indústrias que trabalham no ramo e uma melhor compreensão dos responsáveis e do funcionamento do mercado farmacêutico.

Isto revelou ser um ponto bastante positivo na medida em permitiu desenvolver uma linguagem de comunicação profissional, levando a uma aprendizagem de expressões técnicas e científicas que serão uma mais valia na vida profissional.

3.3.2 Entidade de reputação quer a nível nacional quer a nível Internacional

A oportunidade de estagiar no Infarmed representou uma concretização do meu desejo de poder estar envolvido na gestão de decisões que regulamentam quer o mercado nacional quer o mercado internacional. Visto que o Infarmed apresenta uma reputação singular, poder estar nesta instituição representou um passo significativo na minha carreira académica.

O meu interesse nestas matérias já existia desde a disciplina de Assuntos Regulamentares, portanto foi um enorme privilégio poder estar envolvido numa

instituição onde a missão de servir um bem comum com valores como a legalidade, imparcialidade, justiça, competência, igualdade, transparência, boa-fé e responsabilidade.

O estágio foi exemplo prático de como é possível assegurar a integridade, a independência, a credibilidade, a eficácia e a eficiência no exercício das competências de um colaborador, tendo sido uma oportunidade sem igual.

3.4 Ameaças

3.4.1 Incerteza causada pela possível deslocação da Instituição para o Porto

No dia 21 de novembro de 2017 o Ministro da Saúde Adalberto Campos anunciou a deslocalização do Infarmed para o Porto. Isto veio criar um ambiente de incerteza junto dos colaboradores que acabou por influenciar indiretamente a execução das atividades na instituição devido ao clima gerado.

Este tipo de mudança de estratégia, ao ter influência na vida das pessoas que fazem parte da instituição, tem inevitavelmente repercussões no dia-a-dia do funcionamento da entidade reguladora, com consequências nos resultados globais e na reputação internacional [6].

4. Considerações Finais

Devido ao facto dos assuntos lecionados no MICF apresentarem um carácter mais teórico, as realidades e dinâmica profissionais de qualquer empresa revelam-se um pouco abstratas se o estudante não acompanhar o ensino académico com a execução de estágios.

Neste contexto, a oportunidade de estagiar no Infarmed concretizou um desejo meu de por em prática os conhecimentos teóricos da área regulamentar. Este período resultou numa experiência muito positiva em que todas as expectativas foram ultrapassadas, quer a nível de enriquecimento de conhecimentos, quer a nível de experiência vivida.

Apresento um sincero agradecimento à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e ao corpo docente, pelo ensino de excelência capaz de oferecer várias ferramentas que se apresentam como uma mais valia no futuro profissional de cada estudante. Dirijo ainda uma palavra de apreço a toda a equipa do Infarmed pela disponibilidade e preocupação demonstrada ao longo destes 3 meses gratificantes.

5. Referências Bibliográficas

1. Ordem dos Farmacêuticos, *Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos. Farmacêuticos* [Acedido a 30 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://dre.pt/application/file/a/70186154>
2. Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, *UNIDADE CURRICULAR / Assuntos Regulamentares do Medicamento* [Acedido a 30 de julho de 2018] Disponível na Internet: https://apps.uc.pt/courses/PT/unit/77422/17341/2018-2019?common_core=true&type=ram&id=1172
3. da Silva, J., *Vinte e Cinco Anos de Evolução do INFARMED, I.P.: Os Atuais Desafios Twenty Five Years of Evolution of INFARMED, I.P.: The Current Challenges OPINIÃO E DEBATE.* 2017.
4. INFARMED I.P., *Relatório de Atividades de 2017, 2018.*
5. INFARMED I.P., *Acordos de Colaboração* [Acedido a 30 de julho de 2018] Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/institucional/relacoes-internacionais/acordos>
6. PÚBLICO, *Sede do Infarmed muda de Lisboa para o Porto, 2017.* [Acedido a 30 de julho de 2018] Disponível na Internet: <https://www.publico.pt/2017/11/21/sociedade/noticia/sede-do-infarmed-muda-de-lisboa-para-o-porto-1793367>

Parte III

Development and Characterization of Chitosan-Iminothiolane Modified Porous Silicon Nanoparticles for Oral Delivery of Curcumin

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor António Ribeiro, e pelo Professor Doutor Hélder Santos e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



HELSINGIN YLIOPISTO
HELSINGFORS UNIVERSITET
UNIVERSITY OF HELSINKI

List of Abbreviations

Chitosan-TBA – chitosan-4-thio-butyl-amidine

CUR – Curcumin

DLS – Dynamic light scattering

EDC – 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide

EPR – Enhanced permeability and retention

FTIR – Fourier transform infrared spectrometer

HBSS – Hanks' Balanced Salt Solution Modified

HEPES – HBSS-4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

MES – 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

NHS – N-hydroxysuccinimide

NPs – Nanoparticles

PSi – Porous silicon

s.d. – standard deviation

TEM – transmission electron microscopy

THCPSi – Thermal Hydrocarbonization of Psi

UnTHCPSi – undecylenic acid thermally hydrocarbonized nanoparticles Porous silicon

Abstract

During the last decades, porous silicon (PSi) nanoparticles (NPs) have been representing an important branch of nanotechnology. Due to its advantageous properties, such as biocompatibility, biodegradability and ability to tailor their physicochemical properties, PSi NPs are known for being high efficient drug delivery vehicles for poorly water-soluble drugs, e.g. anticancer agents. In this work, curcumin (CUR), a multipurpose drug agent, was loaded in undecylenic acid thermally hydrocarbonized nanoparticles Psi (UnTHCPSi). NPs were successfully conjugated with chitosan-4-thio-butyl-amidine conjugates (Chitosan-TBA), for oral delivery of CUR. Chitosan-TBA was used to modify the UnTHCPSi nanoparticles to enhance the intestinal permeation of CUR. Surface modification with Chitosan-TBA led to a significant increase in the interaction of PSi NPs with Caco-2/HT29-MTX cell co-culture monolayers. Moreover, among all the investigated solvents, acetone showed to promote the highest loading of CUR into the particles ($3.1 \pm 0.14\%$). Results also demonstrated that Chitosan conjugated UnTHCPSi NPs were not cytotoxic for HT29-MTX and for Caco-2, and thus, they can be promising nanosystems for oral delivery of CUR.

Resumo

Durante as últimas décadas, nanopartículas de silício poroso (PSi) têm representado um ramo importante da nanotecnologia. Devido às suas vantajosas propriedades, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e possibilidade para modificação das suas propriedades físico-químicas, NPs PSi são conhecidas pela alta eficiência enquanto veículos de liberação de fármacos pouco solúveis em água, como por exemplo, agentes anticancerígenos. Neste trabalho, a curcumina (CUR), um fármaco com múltiplos propósitos, foi carregada nas nanopartículas de PSi hidrocarbonizadas termicamente e modificadas com ácido undecilênico (UnTHCPSi). Estas nanopartículas foram conjugadas com sucesso com conjugados de quitosano-4-tio-butil-amidina (quitosano-TBA) para liberação oral de CUR. O Quitosano-TBA foi usado para modificar as nanopartículas UnTHCPSi para melhorar a permeabilidade intestinal da CUR. A modificação da superfície com Quitosano-TBA levou a um aumento significativo de uma interação das NPs PSi com culturas de monocamada de células Caco-2/HT29-MTX. Para além disso entre os solventes investigados, a acetona permitiu o maior carregamento de CUR nas nanopartículas, ($3,1 \pm 0,14\%$). Os resultados também demonstraram que o Quitosano-TBA conjugado com UnTHCPSi NPs não foi tóxico para as células HT29-MTX e para as células Caco-2. Assim, este pode ser um nanossistema promissor para liberação oral de CUR.

1. Introduction

Cancer is one of the leading diseases and cause of death in the world [1]. This situation leads the scientific community to focus on developing new strategies for fighting against this disease.

Most of the actual anticancer drugs are referred as drugs with low bioavailability and narrow therapeutic window [2]. These drawbacks have been giving nanotechnology the opportunity to be the key for the development of novel approaches for cancer therapy. The decrease of particles size is correlated with the surface area increase, and because of this, the drug absorption in intestine also increases [3], together with the increase of bioavailability of the drug. Moreover, with nanoparticles (NPs) it is also possible to increase the drug specific affinity by conjugation with carriers, which allow the drug to reach certain cells/tissues in the body. The ability of the drug to accumulate in the target organ or tissue selectively and quantitatively is known as the enhanced permeability and retention (EPR) effect [4], and it has some advantages as simplification of drug administration protocols, reduction of amount and cost of drug quantity required to achieve a therapeutic effect, and also the possibility to increase the drug concentration in the required sites without negative effects on off-target [5].

Relying on the particles properties, such as pH-sensitivity, biodegradability, and also mechanical properties, e.g. size, surface area, and porosity, the choice between the vast numbers of different nanoparticles should be done according to the needs of the study [6].

In this context, mesoporous materials fulfill most of prerequisites to become a good choice as biomaterial and drug carrier. They have a large surface area ($>700 \text{ m}^2/\text{g}$), which allows for a better drug absorption by increasing its solubility and permeability [7], and additionally to this ability to change the drug dissolution rate particularly for drugs with low dissolution rate, mesoporous materials also have a large pore volume ($> 0.9 \text{ cm}^3/\text{g}$) which can be adapted to different sizes (pore diameters 2–50 nm) [7]. Such property turns the nanoparticle into a reservoir for different drug payloads. Moreover, inside the mesoporous NPs, the loaded drug is confined to a small physical space where crystallization is not possible, which means that the drug will remain in an amorphous-like state when inside the mesopores. This solid state is resistant to pH, to mechanical stress and to fast degradation, and the fact that it is amorphous, also means that it has a better drug dissolution rate, with solubility and permeability enhancement [8].

Chitosan is a polymer obtained by partial deacetylation under alkaline conditions from Chitin [poly(β -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine)] [9]. This is a natural polysaccharide synthesized by a huge number of living organisms, and it is really abundant in nature. It is found as ordered crystalline microfibrils forming structural components in cell walls of fungi and yeast or in the exoskeleton of arthropods [9].

If the degree of deacetylation of chitin achieves values near 50%, it becomes soluble in aqueous acidic media, designated by chitosan. This is the most important chitin derivative in terms of applications, and due to its solubility, it is widely used in different applications as gels, solutions, or fibers and films [9]. Regarding to drug absorption, and due to its positive charge, Chitosan is well-known to be a good mucoadhesive excipient because of its interaction with the negative charged cell membranes [9].

In this study, chitosan-4-thio-butyl-amidine conjugates (chitosan-TBA) was the polymer used. Such polymer is known for providing much higher adhesive properties than other polymers, generally considered to be mucoadhesive [10]. This feature is enhanced probably due to two different mechanisms of mucoadhesion which are: (1) improvement of ionic interaction between the cationic groups of thiolated chitosan and the anionic fraction present in the mucus layer; and (2) the formation of disulphide bonds owing to the introduction of thiol groups into the chitosan structure [11]. The contact between the thiomers and the mucosa can be even more intensified with this higher mucoadhesive property, and using this polymeric carrier systems it is possible to reach a higher epithelial permeability [12].

The production of this thioimer can be easily achieved by the reaction of chitosan with 2-iminothiolane (Traut's reagent), exhibiting promising characteristics for oral drug delivery. Comparing to other thiomers, chitosan 2-iminothiolane conjugate shows a cationic amidine group by which it can firmly interact with the anionic sub-structures, such as sialic acid and sulphonic acid of the cell membrane and with the mucus layer, culminating in a structural reorganization of tight junction-associated proteins, which results in an enhanced paracellular uptake of hydrophilic molecules [13].

The drug used in this study was Curcumin (CUR). CUR is a bioactive compound isolated from the rhizome of the *Curcuma longa* plant (*Curcuma longa* rhizoma), and it has a vast history of use in Indian and Chinese traditional medicine [14]. In these traditions it has been used for the treatment of cough and related respiratory diseases [15] and as an antidiarrheic [16]. Furthermore, this plant has also been used to treat

dental diseases, flatulence, indigestion, digestive disorders such as dyspepsia and acidity, and yet ulcers and many inflammatory conditions in different body regions [17]. CUR is becoming the 'next generation multipurpose drug' by virtue of the multifaceted roles, such as antidiabetic, antimicrobial activities, anti-inflammatory, antioxidant, antiangiogenic and anticancer [17].

From a chemical point of view, CUR is bis- α,β -unsaturated β -diketone which has keto-enol tautomerism. The enol form appears in alkaline medium, while the keto form is frequently in acidic and neutral pH [18]. It is characterized as being a phytochemical with poor aqueous solubility, which is important for its dissolution, absorption and *in-vivo* bioavailability [19]. CUR is also highly unstable in the presence of light (photodegradable). When exposed, it degrades into vanillin, vanillic acid, ferulic aldehyde and ferulic acid [20]. Moreover, it is also rapidly hydrolyzed at physiological pH. At pH alkaline it degrades into trans-6-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2,4-dioxo-5-hexenal, and also into vanillin, ferulic acid and feruloyl methane, but in lower amounts [21, 22]. Regarding to metabolism and half-life, they are responsible for the low *in-vivo* bioavailability of CUR. CUR undergoes rapid metabolism via conjugation (sulfation or glucuronidation) or reduction, followed by high level of systemic clearance from the body [22].

This feature is also responsible for CUR's low clinical efficacy. If orally administered, CUR is eliminated in faeces due to its low solubility, low absorption and yet rapid intestinal metabolism [21]. Furthermore, CUR orally administered is also cleared renally in large quantities in urine, in the form of parent CUR or its glucuronide or sulfate conjugates. Additionally, intravenously/intraperitoneally administered CUR was confirmed to be eliminated primarily in the bile, largely as tetrahydrocurcumin and hexahydrocurcumin glucuronides [18, 23, 24]. The biological activity of CUR metabolites is not as much clarified as CUR. While there are some studies confirming inferior activity [25, 26], there are also some studies that explained the opposite [27].

Regardless of the potential of CUR for different disease applications, but due to its delivery problems, and as a result of the potential of mesoporous materials in nanosize to enhance the biological effect of incorporated drugs possibly by protecting drugs from enzymatic degradation at different pH, increasing drug absorption, providing controlled drug release, altering the drugs' pharmacokinetics and prolonging their residence in plasma, decreasing their toxicity and limiting nonspecific uptake to

undesirable tissues [28-30], it is hypothesized that this kind of systems could be a good challenge to take advantage of CUR benefits and combine both systems.

The study of the potentialities of a system composed by mesoporous silicon nanoparticles modified with chitosan-TBA, and CUR were envisaged as an excellent opportunity to find a promising system for delivery of the drug. In this work, it is presented an initial study about this system where the characterization, drug loading degree, cytotoxicity in cancer cells, and nanoparticle–cell interaction studies were performed in order to provide initial evidence of the potentiality of this system for oral delivery of CUR.

2. Methods and Materials

2.1 Preparation and characterization of porous silicon (PSi) nanoparticles (NPs)

PSi layers were electrochemically anodized from monocrystalline, boron doped p⁺-type Si<100> wafers with a resistivity of 0.01–0.02 Ω.cm using a 1:1 (v/v) hydrofluoric acid (38%)-ethanol electrolyte [18, 37]. The application of repeated pulsed low/high etching profile was done to the multilayer structure. The purpose here was to create fracture planes on the Si wafers at desired intervals. This multilayer film was lifted off from the substrate by increasing the etching current suddenly to the electropolishing region. Then, this fresh PSi multilayer films was exposed to N₂ flow (1 L/min) for at least 30 min to eliminate the residual moisture and oxygen. Later, acetylene (C₂H₂) flow (1 L/min) was added to the N₂ flow during 15 min at room temperature followed by a heat treatment for 15 min at 500 °C under the 1:1 (v/v) N₂/ C₂H₂ flow. Then, wet ball milling was prepared in 1-decene to diminish the surface oxidation, and THCPSi films now produced were allowed to cool down to room temperature under N₂ flow [38]. UnTHCPSi NPs were obtained from THCPSi films by immersing them into undecylenic acid during 16 h at 120 °C and then they milled in ethanol [22].

The characterization of these particles included the average particle size and average zeta-potential measurements by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., UK) at 25 °C. For this measurement, the NPs were suspended in Mili-Q water.

In order to analyze the chemical structure of UnTHCPSi NPs, Fourier transform infrared spectrometer (FTIR) was used. After particles being dried overnight, OPUS 5.5

software in Bruker Vertex 70 FTIR spectrometer was used, and transmittance spectra was recorded between 4000 and 650 cm^{-1} range with 4 cm^{-1} resolution.

The NPs' conjugation with chitosan-TBA (ratio 1:1 UnTHCPSi:Chitosan-TBA) was done with 100 μg of UnTHCPSi suspended in 0.26 mL of 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES) 10 mM (pH 5.2), 0.5 μL of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC, 0.877 g/mL at 20 $^{\circ}\text{C}$) and 0.4 μg of N-hydroxysuccinimide (NHS). Then, this suspension was sonicated for 30 sec, and left stirring for 2 h in the dark and at room temperature. After these 2 h, the particles were sonicated again, and 0.254 mL (0,789%) of chitosan-TBA solution was added, and left for stirring overnight. Then the particles were washed once with solution 0.01 HCl and twice with Milli-Q water, and finally the particles were dispersed in Milli-Q water and stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ until further use.

All analyses were done in triplicate, and the average and standard deviation (*s.d.*) were presented in this report.

2.2 Transmission electron microscopy study

In order to visualize the particles conjugation, one sample of UnTHCPSi and other of UnTHCPSi conjugated with chitosan-TBA were analyzed by transmission electron microscopy (TEM) (TecnaiTM F12, FEI Company, USA). For this purpose, the particles were conjugated as mentioned before, and then were negatively stained with freshly prepared 2% uranyl acetate solution, mounted on a carbon-coated copper grid, air-dried before analysis, and analyzed with TEM using an acceleration voltage of 120 kV.

2.3 Drug loading

For the drug loading studies, 2.5 mg of CUR was weight and dissolved in 1 mL of acetone. After adding 100 mg of UnTHCPSi previously conjugated with chitosan-TBA, samples were left for stirring for 2 h protected from light. After this stirring period, samples were centrifuged for 15 min at 15000 rpm, and the supernatant was taken for further analysis. Afterwards, the NPs were dispersed in 2 mL of acetone, and left for stirring for 2 h in order to achieve drug release. Finally, after this release, all samples were analyzed through CUR absorbance at 425 nm in 96 well-plate (Corning Inc., USA), measured using a Varioskan Flash Multimode Reader at Thermo Fisher Scientific, USA, The final result is achieved by **Equation I**.

$$\text{Drug Loading degree} = \frac{\text{amount of drug release}}{\text{amount of particles}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

2.4 Solvent choice

In order to understand the best solvent to prepare the drug loading study, the NPs already conjugated with chitosan-TBA were washed with three different solvents separately: ethanol, acetone and methanol. Then, the particles were sonicated and the average zeta-potential measurements were done by DLS using a Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., UK) at 25 °C. For these measurements, the particles were suspended in Milli-Q water.

2.5 Cellular viability studies

Cell viability studies were made in intestinal derived cells, HT29-MTX and Caco-2. Separately, these cells were seeded at concentrations of 1×10^5 cells/mL into the 96-well plates (Corning Inc., USA). This way, cells could attach to the wells for 24 h. The medium was then discarded and the cells were washed twice with fresh Hanks' Balanced Salt Solution Modified (HBSS)–4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) buffer (pH 7.4). Then, 100 mL of UnTHCPSi conjugated with chitosan-TBA were added to these cells in different concentrations (50, 100, 250 and 500 mg/mL) and after this, they were incubated for 12 h at 37 °C. Afterwards, cells were washed twice with fresh HBSS–HEPES buffer, and then 50 µL of fresh HBSS–HEPES buffer and 50 µL of CellTiter- Glo® reagent assay (Promega Corporation, USA) were added to the wells, as described elsewhere [31]. A negative (HBSS–HEPES buffer solution) and a positive control (1% triton X-100) were also used and treated in the same way as the sample wells. The luminescence was measured using Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific, USA).

2.6 Cellular interaction study

Cellular interaction studies were conducted in HT29-MTX and Caco-2 cells. UnTHCPSi were conjugated first with AlexaFluor® in order to have a component which would give a light signal for detection in confocal fluorescence microscope. This first conjugation (AlexaFluor 1:70 UnTHCPSi) was done after UnTHCPSi activation, as it was

prepared for chitosan-TBA conjugation. Then, the particles were conjugated with chitosan-TBA. For this study, cells were seeded in 8-chamber slides individually (ratio 9:1 Caco-2/HT29-MTX) and left to attach overnight (250 μ L of cell suspension at concentration of 2×10^5 cells/mL for each chamber). Then, the cells were washed twice with HBSS buffer solution (pH 7.4), and 200 μ L of UnTHCPSi (concentration of 250 μ g/mL) were added. After this, cells were incubated at 37 °C for 3 h and then they were washed with buffer and stained by CellMask™ DeepRed for 3 min. Cells were washed twice to clear the excess of staining, and fixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for 20 min. Finally, the cell-NP interactions were evaluated under confocal fluorescence microscopy (Leica Microsystems, Germany).

3. Results and Discussion

3.1. Preparation, characterization and functionalization of PSiNPs

For this conjugation, EDC/NHS coupling chemistry allowed the activation of the UnTHCPSi's carboxylic groups. This reaction was made in 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer, an aqueous solution without extraneous carboxyls and amines, which is suitable for crosslinking with chitosan-TBA at pH 5.2.

As shown in the results from DLS in **Table I**, it is possible to understand that the conjugation was well succeeded, because the zeta-potential had a positive value, resulting from the conjugation of UnTHCPSi (negative zeta-potential) with the even more positive value from chitosan-TBA value (11.8 ± 0.6 mV). If the particles were not be conjugated, the zeta-potential value would be negative owing to the washes done to the particles. These steps would take all chitosan added to the surface of the NPs, because all supernatant would be gone, which means that chitosan-TBA would not be in the final NP sample.

The size of particles after the conjugation was 334 ± 23 nm and they are included in the nanosize range, which means that these particles can achieve all the advantages already mentioned before in this report related with nanoformulations.

The PDI value of the NPs means that the homogeneity was achieved after the conjugation (0.34 ± 0.09), which means that particles were well disperse.

Table 1. Particle size, PDI, zeta (ζ)-potential.

	ζ -potential	PDI	Size(nm)
Un THC PSi NPs-chitosan TBA	11.8 ± 0.6	0.34 ± 0.09	333.6 ± 23.1

TEM visualization of the NPs can also be used to prove the morphology and shape of the NPs before and after the surface conjugation. In both figures it is possible to see an irregular morphology of the NPs and to see the porous structure of PSi that allows the drug loading. However, comparing **Figures 1a** and **1b** it is possible to understand that they are quite different, because in **Figure 1b** chitosan-TBA was conjugated to the UnTHCPSi's surface. This difference is the point that confirms once more that UnTHCPSi were successfully conjugated with chitosan-TBA.

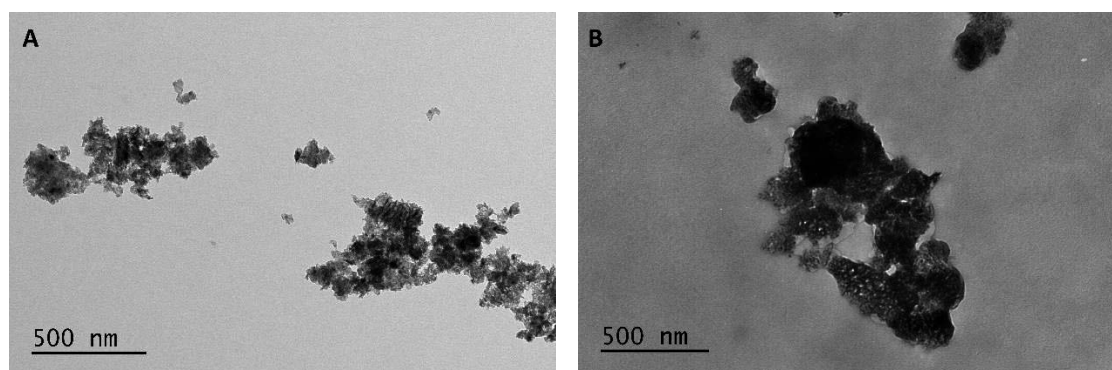


Figure 1. TEM images of UnTHCPSi obtained by Tecnai™ F12, FEI Company, USA. (A) UnTHCPSi NPs non-conjugated, and (B) UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA.

Regarding to FTIR analyses, two samples were tested: non-conjugated UnTHCPSi NPs and UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA (**Figure 2**). This study was performed in order to compare samples by some UnTHCPSi NPs characteristic peaks'

change after the surface conjugation, to analyze the existence of new peaks specific for sulfur group of chitosan-TBA and also specific for chitosan alone.

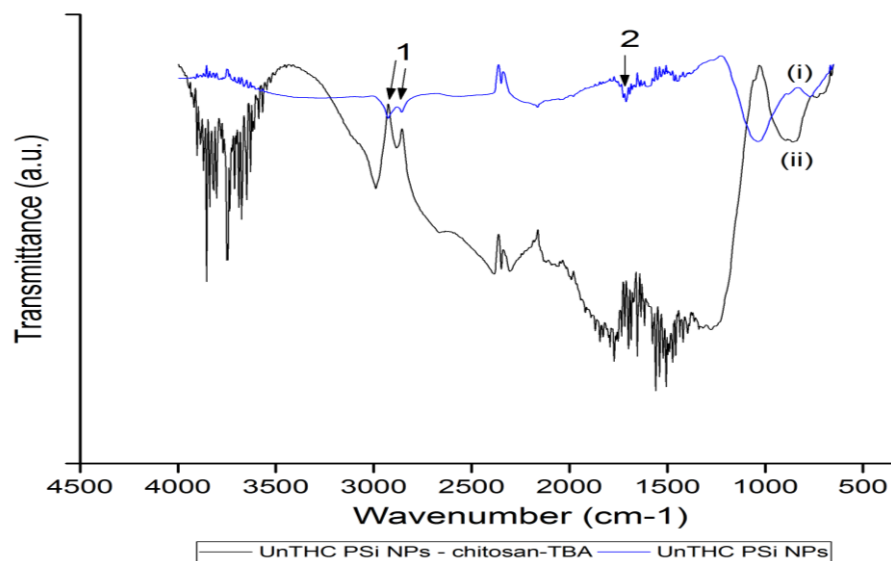


Figure 2. FTIR spectra of (i) UnTHCPSi NPs and (ii) UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA. Band 1: Stretching of the long linear aliphatic chain of the undecylenic acid of the NPs (2970 cm^{-1} ; 2816 cm^{-1}); Band 2: Stretching of carbonyl groups of the free carboxylic groups (1713 cm^{-1}).

The expected results should show some relevant peaks for the analyzed samples. From the literature it is known for UnTHCPSi NPs that (C=O) group should be seen at 1713 cm^{-1} for stretching of carbonyl groups of the free carboxylic groups [32]; and also (CH) group should be seen at 2970 and 2816 cm^{-1} for stretching of the long linear aliphatic chain of the undecylenic acid of the NPs [32]. For Chitosan, it is expected to be seen a peak of ($-\text{CH}_2$) group at 2920 cm^{-1} [33], and for the thiol group of chitosan 2-iminothiolane, it is expected to be present a signal between $800\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ [34]. This last signal is not expected to be seen clearly because this instrument does not measure near-infrared wavenumbers.

In our study, it is possible to verify that peaks related to UnTHCPSi NPs are present in UnTHCPSi NPs non-conjugated spectra (bands 1 and 2), while regarding to the other spectra is not possible to conclude anything. Owing possibly to weak drying of the FTIR's crystal, or to contamination of some solvent used to wash the crystal while changing samples, it is not possible to take any conclusion about the second sample. This study should be repeated at least for the conjugated particles.

3.2. Solvent Choice

Before the drug loading process, it was demanded to study some solvents in order to understand which solvent would be better to proceed to the drug loading process. For this study, methanol, ethanol and acetone were compared between them (**Figure 3**). Particles were conjugated as previously explained, and after being washed, they have been stirring for 2 h with each solvent. Afterwards, they were washed, and then they were analyzed by DLS. The value that had minor zeta-potential change was chosen for the drug loading studies, because by this way it would be warranted that crosslinking would not be damaged during the drug loading studies.

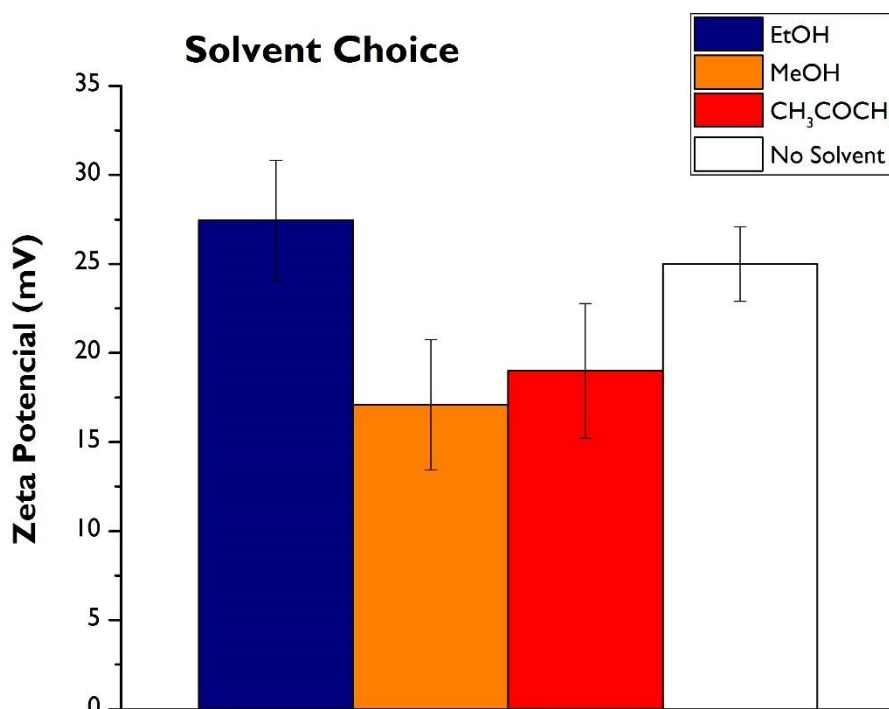


Figure 3. Solvent choice study. UnTHCPSi conjugated with chitosan were stirred with ethanol, methanol and acetone for 2 h and then washed and analyzed by DLS Zetasizer Nano ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., UK) at 25°C. Experiments were done in duplicate and samples were measured three times. One sample was not tested and was used as control.

The results of this experiment suggest that ethanol would be the best solvent to use in the drug loading studies; however, the drug loading experiments done show that acetone would be the best solvent for the drug loading process. This means that something unusual happened, and this study should be repeated.

3.3. Drug loading studies

For the drug loading studies, CUR powder was dissolved in acetone. With acetone, the drug loading degree was done in duplicate, and each sample was measured twice. The final result, which is achieved by **Equation 1** was in an average loading degree of 3.1 ± 0.14 %. Ethanol was tested before; however, results were never good enough. In the future, this study should be repeated in order to achieve better drug loading degree trying different solvents that were not tested here.

3.4. In vitro cell viability study

The *in vitro* viability study in Caco-2 and HT29-MTX cells was analyzed by exposing the cells to UnTHCPSi conjugated with chitosan-TBA at different concentrations (50, 100, 250, and 500 mg/mL) and also to non-conjugated UnTHCPSi for 12 h of incubation. The interaction between the nanoparticles and cells can be influenced by different properties, such as size, surface charge, composition, surface functional groups and the presence of targeting moieties [35-37]. The results presented in **Figure 4** showed that the conjugated particles were not harmful for either type of cells tested. Moreover, it is also shown in **Figure 4** that higher concentrations were more cytotoxic than lower concentrations. This occurred in both kind of cells, and also in all types of particles.

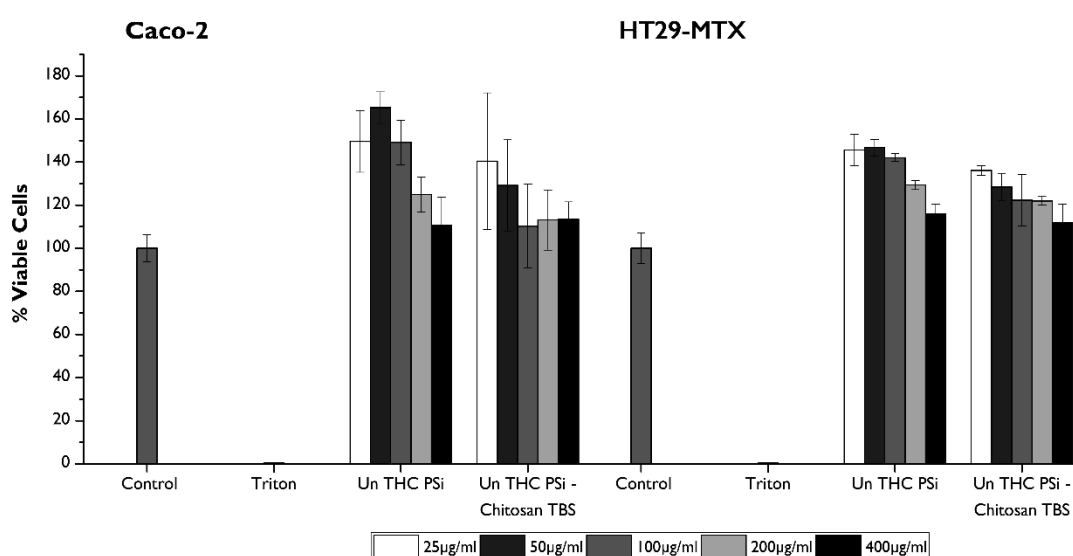


Figure 4. Cell viability of the intestinal cells exposed to UnTHCPSi (non-conjugated and conjugated with chitosan-TBA), assessed by the CellTiter-Glo[®] luminescence assay. The ATP content of HT29-MTX and Caco-2 cells after 12 h incubation with different UnTHCPSi (non-

conjugated and conjugated with chitosan-TBA) concentrations at 37 °C. Error bars represent mean \pm s.d. (n = 4).

3.5. Interaction study

Interaction between UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA and Caco-2/HT29-MTX cells was assessed by confocal fluorescence microscopy. The green fluorescence represents the loaded particles conjugated with chitosan-TBA and the red fluorescence is the result from CellMask™ DeepRed, which labels the cellular membrane, as shown in **Figure 5**. For this study, it was used a chamber with cells that had no contact with particles that were used as control sample. In this sample, it is only possible to see red fluorescence which is the result of CellMask™ DeepRed that gives red fluorescence for the cellular membrane (**Figure 5a**).

Non-conjugated UnTHCPSi NPs presented no green fluorescence, which means that it has minimal or no interaction with cells (**Figure 5b**). Furthermore, UnTHCPSi NPs conjugated with Chitosan-TBA has a remarkable green fluorescence, which indicated that this conjugation with chitosan-TBA is advantageous for increasing the mucoadhesion of the particles to the cell surface and to improve the drug permeation across the intestinal cells (**Figures 5c and 5d**).

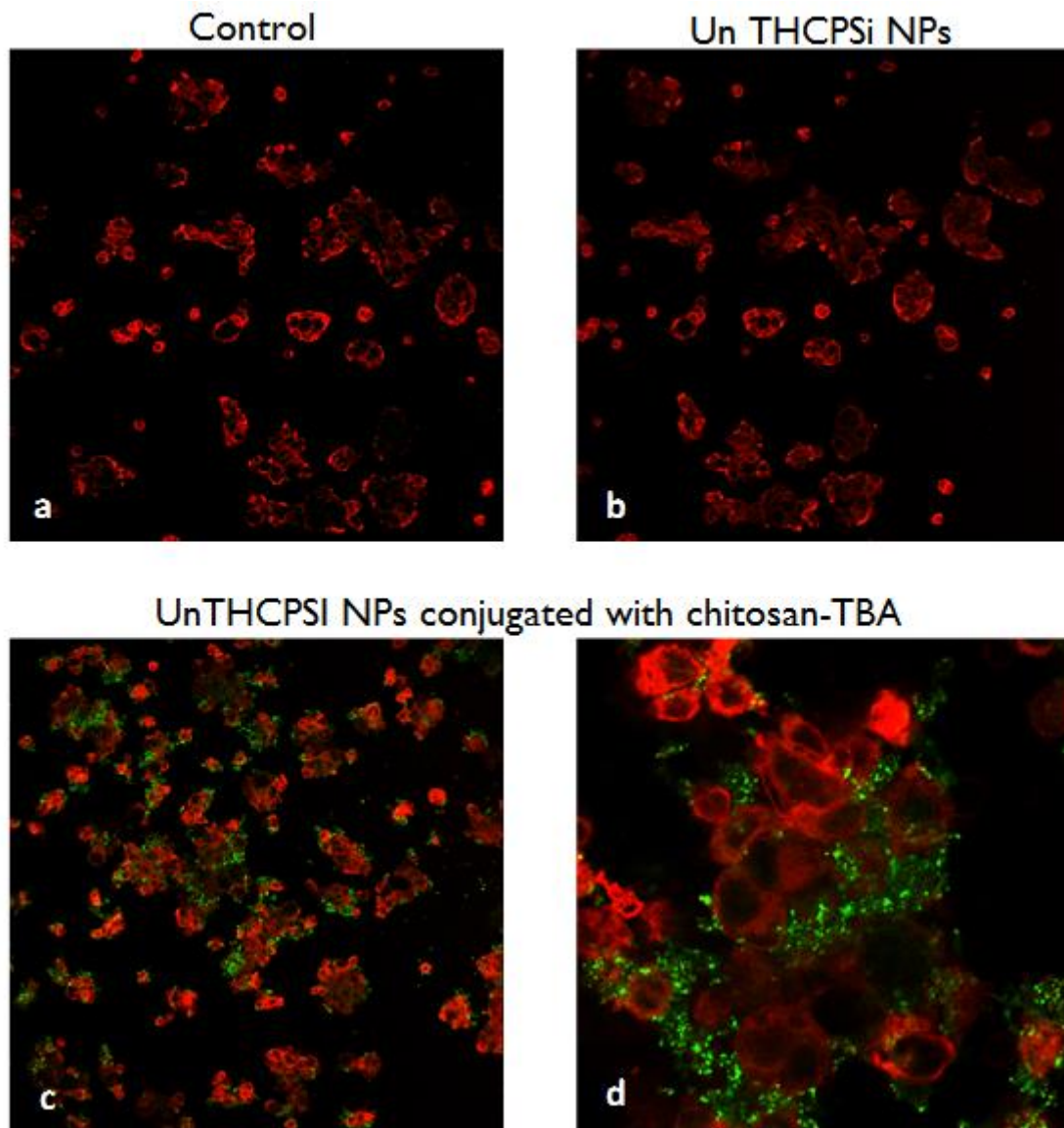


Figure 5. Fluorescent micrographs of Caco-2/HT29-MTX co-culture monolayers without NP treatment (a), treated with UnTHCPSi NPs (b), and (c) and (d) treated with UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA. NPs (250 mg/mL) were analyzed after incubation with the cells at 37 °C for 3 h. Cell membranes were stained with CellMask™ DeepRed (red), and the NPs were stained with AlexaFluor®(green).

4. Conclusions

In this study, UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA were developed to enhance the intestinal permeability of CUR. Firstly, the system was characterized by DLS, TEM imaging, and FTIR. Then, CUR was loaded into the pores of UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA and the drug loading degree was studied. *In vitro* experiments suggested that UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA were found to increase the interactions with the mucus monolayer of intestinal cells, thereby coming in close contact with the cell surface. This improved interaction of the UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA was clearly shown in the confocal fluorescence microscope studies. These results suggested that the UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA may be a promising carrier system for enhancing the intestinal permeability of CUR. However, a future system composed by these three elements, PSi NPs, chitosan-TBA and CUR, needs to be improved and continued.

Furthermore, the studies performed in the present work point out the potential of the nanosystem for oral delivery of CUR. Besides CUR, the nanosystem composed by UnTHCPSi NPs conjugated with chitosan-TBA proposed here indicates good potential as nanocarrier system for oral delivery for other drugs in the same situation such as CUR.

For further developments, it is recommended to perform other studies in addition to the ones conducted here, namely permeability studies which allows to understand if the transport of CUR across the intestinal cell membrane can be increased.

References

1. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *The Global Burden of Cancer 2013*. JAMA Oncology, 2015. **1**(4): p. 505-27.
2. Stuurman, F.E., et al., *Oral anticancer drugs: mechanisms of low bioavailability and strategies for improvement*. Clinical Pharmacokinetics, 2013. **52**(6): p. 399-414.
3. des Rieux, A., et al., *Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach*. Journal of Controlled Release, 2006. **116**(1): p. 1-27.
4. Wicki, A., et al., *Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications*. Journal of Controlled Release, 2015. **200**: p. 138-57.
5. Torchilin, V.P., *Drug targeting*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **11**, **Supplement 2**: p. S81-S91.
6. Mitragotri, S. and J. Lahann, *Physical approaches to biomaterial design*. Nature Materials 2009. **8**(1): p. 15-23.
7. Santos, H.A., et al., *Mesoporous materials as controlled drug delivery formulations*. Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2011. **21**(2): p. 139-155.
8. Hancock, B.C. and M. Parks, *What is the True Solubility Advantage for Amorphous Pharmaceuticals?* Pharmaceutical Research, 2000. **17**(4): p. 397-404.
9. Rinaudo, M., *Chitin and chitosan: Properties and applications*. Progress in Polymer Science, 2006. **31**(7): p. 603-632.
10. Bernkop-Schnurch, A., *Chitosan and its derivatives: potential excipients for peroral peptide delivery systems*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **194**(1): p. 1-13.
11. Kast, C.E. and A. Bernkop-Schnürch, *Thiolated polymers — thiomers: development and in vitro evaluation of chitosan–thioglycolic acid conjugates*. Biomaterials, 2001. **22**(17): p. 2345-2352.
12. Bernkop-Schnurch, A. and S. Steininger, *Synthesis and characterisation of mucoadhesive thiolated polymers*. International Journal of Pharmaceutics, 2000. **194**(2): p. 239-247.
13. Bernkop-Schnürch, A., *Thiolated polymers—thiomers: synthesis and in vitro evaluation of chitosan–2-iminothiolane conjugates*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **260**(2): p. 229-237.

14. Vecchione, R., et al., *Curcumin bioavailability from oil in water nano-emulsions: In vitro and in vivo study on the dimensional, compositional and interactional dependence*. *Journal of Controlled Release*, 2016.
15. Aggarwal, B.B., et al., *CURCUMIN: THE INDIAN SOLID GOLD*, in *The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease*, B.B. Aggarwal, Y.-J. Surh, and S. Shishodia, Editors. 2007, Springer US: Boston, MA. p. 1-75.
16. Anuchapreeda, S., et al., *Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on WTI gene expression in leukemic cell lines*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2007. **62**(4): p. 585-594.
17. Aparna Suhagm Jaya Dixit, P.D., *Role of curcumin as a subgingival irrigant: pilot study*. *Periodontal Practice Today*, 2007. **Vol. 4**(2): p. 115-121.
18. Sharma, R.A., A.J. Gescher, and W.P. Steward, *Curcumin: the story so far*. *European Journal of Cancer*, 2005. **41**(13): p. 1955-68.
19. Preetha Anand, A.B.K., † Robert A. Newman,‡ and B.B. Aggarwal, *Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises*. *Molecular Pharmaceutics*, 2007. **4**(6): p. 807-818.
20. CYLENI R.A. SOUZA, S.F.O.a.M.B.A.G.R., *STABILITY OF CURCUMINOID PIGMENTS IN MODEL SYSTEMS*. *Journal of Food Processing and Preservation* 1997(21): p. 353-363.
21. M. H. Pan, T.M.H., and J. K. Lin, *Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice*. *Drug Metabolism and Disposition*, 1999. **27**(1): p. 486-494.
22. Marczylo, T.H., et al., *Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine*. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2007. **60**(2): p. 171-177.
23. Holder Gm Fau - Plummer, J.L., A.J. Plummer JI Fau - Ryan, and A.J. Ryan, *The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) in the rat*. *Xenobiotica*, 1978. **8**(12): p. 761-8.
24. Ravindranath V Fau - Chandrasekhara, N. and N. Chandrasekhara, *Metabolism of curcumin—studies with [3H]curcumin*. *Toxicology*, 1981-1982. **22**(4): p. 337-44.
25. Sandur, S.K., et al., *Curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin, tetrahydrocurcumin and turmerones differentially regulate anti-inflammatory and anti-*

- proliferative responses through a ROS-independent mechanism. Carcinogenesis, 2007. 28(8): p. 1765-73.*
26. Ireson, C.R., et al., *Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. Cancer Epidemiology, Biomarkers & prevention, 2002. 11(1): p. 105-11.*
 27. Pfeiffer, E., et al., *Curcuminoids form reactive glucuronides in vitro. Journal of agricultural and food chemistry, 2007. 55(2): p. 538-44.*
 28. Shakeri A Fau - Sahebkar, A. and A. Sahebkar, *Opinion Paper: Nanotechnology: A Successful Approach to Improve Oral Bioavailability of Phytochemicals. Recent patents on drug delivery & formulation, 2016. 10(1): p. 4-6.*
 29. Jeetah R Fau - Bhaw-Luximon, A., D. Bhaw-Luximon A Fau - Jhurry, and D. Jhurry, *Nanopharmaceutics: phytochemical-based controlled or sustained drug-delivery systems for cancer treatment. Journal of Biomedical Nanotechnology 2014. 10(9): p. 1810-40.*
 30. Gharpure, K.M., et al., *Nanotechnology: Future of Oncotherapy. Clinical Cancer research, 2015. 21(14): p. 3121-30.*
 31. Shahbazi, M.A., et al., *The mechanisms of surface chemistry effects of mesoporous silicon nanoparticles on immunotoxicity and biocompatibility. Biomaterials, 2013. 34(31): p. 7776-89*
 32. Ferreira, M.P.A., et al., *In vitro and in vivo assessment of heart-homing porous silicon nanoparticles. Biomaterials, 2016. 94: p. 93-104.*
 33. Suédina M.L. Silva, C.R.C.B., Marcus V.L. Fook, and L.H.C.a.E.L.C. Claudia M.O. Raposo, *Application of infrared spectroscopy to analysis of chitosan clay nanocomposites. Materials Science, Engineering and Technology, 2012.*
 34. Viral, H.S., *Design and evaluation of thiolated chitosan based mucoadhesive and permeation enhancing bilayered buccal drug delivery system. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012. 6(7).*
 35. Kumari, A. and S.K. Yadav, *Cellular interactions of therapeutically delivered nanoparticles. Expert Opinion on Drug Delivery, 2011. 8(2): p. 141-151.*
 36. Verma, A. and F. Stellacci, *Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions. Small, 2010. 6(1): p. 12-21.*
 37. Nel, A.E., et al., *Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. Nature Materials, 2009 8(1476-1122 (Print)): p. 543 - 557.*