



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Cíntia Baptista Marques

Relatório de Estágio e Monografia intitulada “Preparation of Chitosan Nanoparticles for Insulin Delivery and Other Therapeutic Agents” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação, respetivamente, do Dr. Jonatas Borralho Mangas e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2018

Faculdade de Farmácia

PREPARATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR INSULIN DELIVERY AND OTHER THERAPEUTIC AGENTS

Cíntia Baptista Marques

Relatório de Estágio e Monografia intitulada "Preparation Of Chitosan Nanoparticles For
Insulin Delivery And Other Therapeutic Agents"
referentes à Unidade Curricular "Estágio", sob a orientação do
Dr. Jonatas Borralho Mangas e da Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro
e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra,
para apreciação na prestação de provas públicas de
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro de 2018

Eu, Cíntia Baptista Marques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013150701, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatório de Estágio e Monografia intitulada "*Preparation Of Chitosan Nanoparticles For Insulin Delivery And Other Therapeutic Agents*" 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, 06 de setembro de 2018.

Cíntia Baptista Marques

"Começa por fazer o que é necessário, depois o que é possível e de repente estarás a fazer o impossível"

São Francisco de Assis

Foi financiado por fundos da European Regional Development Fund (ERDF), através do Centro 2020 Regional Operational Programme com o projecto CENTRO-01-0145-FEDER-000008:BrainHealth 2020, e através do COMPETE 2020 - Operational Programme for Competitiveness and Internationalisation e fundos nacionais via FCT – Fundação para a Ciência e Tecnologia, I.P., com os projetos PROSAFE/0001/2016 e POCI-01-0145-FEDER-007440 (UID/NEU/04539/2013), e pela bolsa de mobilidade europeia atribuída ao abrigo do programa Swiss European Mobility Programmes (SEMP).



Agradecimentos

À Professora Doutora Olga Maria Fernandes Borges Ribeiro, minha orientadora de monografia, por todo o tempo disponibilizado e por todos os conselhos que me permitiram levar este último trabalho a bom porto. Mas sobretudo, um agradecimento especial por ter apostado e acreditado no meu potencial nos últimos 2 anos, que me proporcionaram, sem dúvida, um crescimento a nível pessoal e profissional. O meu grande obrigado!

Ao Dr. Jonatas Borralho Mangas, Diretor Técnico da Farmácia dos pastorinhos e meu orientador de estágio, pelo acolhimento caloroso e por toda a sabedoria transmitida.

À equipa da Farmácia dos Pastorinhos, nomeadamente, ao Dr. João, à Dr.^a Marylin, à Dr.^a Rute, à Dr.^a Raquel e à Dr.^a Dina, por me terem recebido de braços abertos e por toda a disponibilidade para o esclarecimento de todas as minhas (muitas) questões durante todo o estágio. Foi um prazer!

Um agradecimento especial ainda a toda a equipa do NanoLab – à Doutora Sandra, à Doutora Patrícia, à (quase) Doutora Edna, à Dr.^a Mariana e à Dr.^a Alana por me terem acompanhado e apoiado sempre!

Ao Professor Doutor Gerrit Borchard, por ter aceitado prontamente o meu estágio no seu laboratório da Universidade de Genebra, e, ainda, um agradecimento especial à Doutora Van Nguyen e à Doutora Viorica Patrulea, por terem acompanhado e apoiado todo o meu trabalho durante o decorrer da parceria entre a Universidade de Genebra e a Faculdade de Farmácia de Coimbra.

Aos meus amigos, aos que já me acompanhavam e àqueles que Coimbra me deu, pela partilha de alegrias e dificuldades e por todo o apoio, pois, sem vós, o percurso teria sido mais sinuoso. O meu obrigada!

Por fim, mas não menos importante, um obrigado à minha família, por estarem presentes e perdoarem todas as ausências!

Parte I

Relatório de Estágio

ESTÁGIO CURRICULAR EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA

Índice

Abreviaturas.....	iv
1. Introdução.....	1
2. A Farmácia dos Pastorinhos	3
3. Análise SWOT	5
3.1. Forças	5
3.2. Fraquezas	6
3.3. Oportunidades	7
3.4. Ameaças.....	11
4. Exemplos de casos práticos.....	13
5. Conclusão	14
6. Bibliografia.....	15

Abreviaturas

DCI – Denominação comum internacional

GSK – GlaxoSmithKline

MSRM – Medicamentos sujeitos a receita médica

OTC – Do inglês *Over The Counter*

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

I. Introdução

De acordo com o Código Deontológico Da Ordem Dos Farmacêuticos “O farmacêutico é um agente de saúde, cumprindo-lhe executar todas as tarefas que ao medicamento concernem, todas as que respeitam às análises clínicas ou análises de outra natureza de idêntico modo susceptíveis de contribuir para a salvaguarda da saúde pública e todas as acções de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde”. Desta forma, enquanto agente de saúde pública, a “primeira e principal responsabilidade do farmacêutico é para com a saúde e o bem-estar do doente e do cidadão em geral” [1].

A habilitação ao exercício da profissão de Farmacêutico pressupõe a conclusão do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Neste sentido, o Estágio Curricular em Farmácia Comunitária faz parte das 5 áreas científicas obrigatórias necessárias à conclusão da formação em Ciências Farmacêuticas (Ciências Físico-Químicas, Ciências Biológicas e Biomédicas, Ciências Farmacêuticas, Matemática e Estágio) [2]. Este, e passo a citar, é um “estágio de natureza profissional objecto de relatório final, consoante os objectivos específicos visados, nos termos que sejam fixados pelas respectivas normas regulamentares, a que corresponde um mínimo de 35% do total dos créditos do ciclo de estudos.” [3][4].

O meu estágio curricular decorreu na Farmácia dos Pastorinho (Fátima), tendo início a 2 de abril de 2018 e terminado a 30 de junho do mesmo ano. A Farmácia dos Pastorinhos é umas das mais recentes da cidade de Fátima e, enquanto utente da farmácia, sempre me suscitou curiosidade pela grande variedade de produtos disponibilizada. Demonstra ainda uma grande disponibilidade para apoiar diversos eventos e causas sociais, tendo, por exemplo, estado presente na “Corrida da Paz”.

Como irá ser desenvolvido ao longo deste relatório, ao longo do estágio tive a oportunidade de contactar com as diversas componentes do quotidiano na farmácia, tais como gestão de *stock*, verificação e receção de encomendas, organização e gestão da farmácia, gestão de lineares, dispensa de medicamentos e indicação farmacêutica.

Este relatório encontra-se organizado na forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*), permitindo realizar uma análise interligada dos diversos pontos relevantes ao longo do estágio. No seu todo, a análise SWOT corresponde ao estudo das vertentes internas e externas da envolvente.

Externamente, examinam-se as oportunidades (*Opportunities*) e as ameaças (*Threats*) que estão fora do controlo, neste caso, do estagiário, mas que de alguma forma influenciaram o seu trabalho e verifica-se ainda, no caso das ameaças, como é que estas poderão ser contornadas [5].

Relativamente à vertente interna, esta analisa os pontos fortes (*Strengths*) e os pontos fracos (*Weaknesses*) do estagiário, explorando a forma como estes afetaram o seu desempenho no decorrer do estágio curricular e, no caso das fraquezas, como é que estas poderão ser controladas [5].

2. A Farmácia dos Pastorinhos

A Farmácia dos Pastorinhos encontra-se situada no centro da cidade de Fátima, na Avenida Beato Nuno, próxima do Santuário de Nossa Senhora de Fátima. Labora entre as 8h30 e as 20h nos dias úteis, e aos sábados das 9h às 19h. Esta farmácia encontra-se integrada no grupo Sanches, que engloba ainda a sua homónima, Farmácia Sanches (Leiria), a Farmácia Caxarias (Caxarias, Ourém) e a Farmácia Ferraz (Batalha).

Esta foi pioneira na oferta de alguns serviços na região, tais como o *Farmadrive*, respondendo às exigências de utentes, uma vez que permite um serviço cómodo e rápido aos utentes, sem que estes necessitem de sair dos seus carros para levantar as suas receitas médicas e os demais produtos de saúde. A Farmácia dos Pastorinhos dispõe ainda de serviço de entregas ao domicílio e permite a realização de encomendas através do seu *site* online.

O Grupo Sanches faz da oferta de uma grande variedade de produtos uma das suas imagens de marca. Além da venda de medicamentos sujeitos a receita médica (MSRM) e dos *over the counter* (OTC), transversais a todas as farmácias, há também a aposta em produtos de fitoterapia, homeopatia, puericultura, alimentação infantil, suplementos alimentares, dermocosmética, ortopedia, incontinência e infeção urinária, veterinária entre outros. Paralelamente, observa-se a constante aposta na formação dos profissionais da equipa, garantindo o aconselhamento especializado relativamente aos produtos referidos [6].

A farmácia oferece também um conjunto de serviços farmacêuticos que valorizam a sua atividade. Particularmente, a realização de testes bioquímicos com vista ao *check up* e acompanhamento de patologias, tais como diabetes, hipertensão arterial e dislipidemias, sendo ainda possível proceder à administração de vacinas e injetáveis e à preparação da terapêutica.

É de notar que a grande maioria da preparação da terapêutica é realizado em parceria com os lares e instituições. Na realidade, estas parcerias influenciam, em muito, não só o volume de vendas (numa perspetiva económica), mas também a gestão de recursos humanos, uma vez que estas exigem um grande dispêndio de tempo preparação da terapêutica em si e na dispensa dos produtos. No final, estas colaborações permitem um grande dinamismo, o que é muito positivo.

As instalações modernas e a existência de diversos gabinetes permitem ainda a forte aposta em diversos serviços com vista à sua diferenciação. Nomeadamente, na Farmácia dos Pastorinhos é possível ter acesso a consultas de nutrição e dietética, podologia e acupuntura.

Acresce ainda uma grande aposta na presença de conselheiras das variadas marcas de dermocosmética e na promoção de ações de formação aos utentes à cerca de variados

temas tais como “Pele atópica do bebé” e “Soluções naturais durante a gravidez e amamentação”.

Para além disto, a responsabilidade social e promoção da saúde são pilares que se manifestam através da realização de ações de sensibilização nas suas instalações no âmbito da celebração, por exemplo, do Dia do Chá, do Dia Mundial Sem Tabaco, do Dia da Hipertensão e do Mês do Coração – com a realização de rastreios cardiovasculares gratuitos. De mencionar ainda a realização de formações nas escolas para a sensibilização à cerca de temas adequados às diversas idades escolares – uso de proteção solar, pediculose, etc.

Na sociedade atual, cada vez mais informada e autónoma na busca de informação, a participação nas redes sociais é imperativa para chegar junto da população. Desta forma, a página de Facebook da Farmácia dos Pastorinhos, além de plataforma de divulgação de campanhas e serviços, é ainda uma mais valia na transmissão de informação. Recentemente, foi criada a rúbrica “Farmacêutica online” que consiste na divulgação semanal de factos e conselhos sobre questões pertinentes relativas a determinadas patologias e ao medicamento. A Farmácia dispõe ainda de um *site* online onde os utentes podem, de forma intuitiva, ter acesso a informação sobre serviços, notícias, produtos, etc.

De ressaltar que todas as atividades e dinâmicas mencionadas são possíveis devido à existência de uma equipa jovem, empática, motivada e determinada. Focada nos seus objetivos enquanto profissionais e enquanto equipa, mas sobretudo, no utente, contribuindo, sem dúvida, para a valorização dos farmacêuticos enquanto agentes de saúde pública.

3. Análise SWOT

3.1. Forças

Background científico

Os conhecimentos teóricos e práticos adquiridos ao longo da formação académica no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas foram sem dúvidas essenciais para o meu desempenho ao longo do estágio curricular. Ainda que toda a formação tenha sido importante, destaco as unidades curriculares de Farmacologia I e II, Farmacoterapia, Farmácia clínica, Intervenção Farmacêutica, Farmácia Galénica e Organização e Gestão Farmacêutica, uma vez que forneceram bases essenciais para responder positivamente aos vários desafios que me foram colocados durante o estágio curricular.

Autonomia e interesse na aprendizagem

Ainda que as bases teóricas essenciais tenham sido transmitidas pela formação académica, é um facto que o estágio curricular (parte integrante da nossa formação académica) foi essencial para a consolidação de conhecimentos já adquiridos e para colmatar algumas lacunas (3.2. Fraquezas).

Para tal, além da grande disponibilidade da equipa (3.3. Oportunidades) foi essencial a autonomia no esclarecimento de dúvidas, por exemplo, no que diz respeito ao estabelecer conexão entre os medicamentos de marca e os respetivos princípios ativos, esclarecimento de indicações terapêuticas, posologia e contraindicações de determinados fármacos (3.2. Fraquezas). Para tal, ferramentas como o Infomed, Sifarma 2000[®] e Prontuário terapêutico foram essenciais.

Além da prática diária, a autonomia em explorar o sistema Sifarma 2000[®] permitiu uma mais rápida adaptação ao sistema e também para uma maior facilidade em realizar as diversas tarefas que me iam sendo propostas.

Formação em medição de parâmetros bioquímicos

Por forma a realizar rastreios cardiovasculares, frequentei a ação de formação no âmbito da deteção e controle dos fatores de risco das Doenças Cardiovasculares, conduzida pela Delegação Centro da Fundação Portuguesa de Cardiologia (Coimbra), em 2015. Esta permitiu-me adquirir as bases técnicas e também teóricas para realizar as medições de glicémia, colesterol e tensão arterial, e proceder a um aconselhamento farmacêutico de maior qualidade à cerca destes parâmetros - uma componente importante do meu estágio na farmácia.

Outros estágios realizados

Ao longo do meu percurso académico, procurei sempre frequentar estágios de verão nas pausas letivas, como complemento à minha formação académica. Realizei estágios nas áreas da Farmácia Comunitária, Controlo de Qualidade, Assuntos Regulamentares e Investigação. Ainda que na, sua maioria, sejam área distintas da Farmácia Comunitária, todas contribuíram para a aquisição de experiência no mundo real do trabalho, para uma maior capacidade de adaptação a diferentes ambientes e, obviamente, para facilitar a aquisição de novos conhecimentos uma vez que são áreas complementares das Ciências Farmacêuticas, facilitando a compreensão de temas inter-relacionados. Em suma, foram experiências relevantes para o sucesso do meu estágio curricular.

3.2. Fraquezas

Lacunas de conhecimento

Apesar do *background* científico fornecido pelo plano curricular fornecer muitos conhecimentos necessários à realização do estágio, há determinadas áreas que, talvez por falta de tempo, não são exploradas. Nomeadamente áreas como homeopatia, puericultura, alimentação infantil, suplementos alimentares, dermocosmética e ortopedia. Para superar estas dificuldades foram de extrema importância os esclarecimentos prontamente prestados por toda a equipa e também as várias formações frequentadas (3.3. Oportunidades).

Relativamente aos medicamentos veterinários, ainda que tenhamos tido alguma formação teórica na cadeira de “Preparações de Uso Veterinário”, senti uma grande dificuldade e insegurança no aconselhamento prático deste tipo de produtos, talvez por falta de uma componente mais focada no aconselhamento farmacêutico prático na formação específica para esta área.

Conhecimentos de inglês, francês e espanhol

A localização da farmácia num local de turismo religioso aumenta o leque de utentes da farmácia. Para além dos utentes habituais e utentes pontuais temos ainda o tipo de utente a que chamamos “utente peregrino”. O meu desconhecimento de línguas, como o francês e o espanhol, e eventuais falhas de vocabulário de inglês relativos ao aconselhamento farmacêutico, dificultaram (ou impediram) a realização de alguns atendimentos. Destaco o apoio sempre pronto da equipa da Farmácia dos Pastorinho (3.3. Oportunidades) para me auxiliar neste tipo de situações.

Inexperiência

A inexperiência no atendimento e aconselhamento aos utentes foram evidentes na fase inicial de atendimento ao público. Tal contribuía para a timidez inicial e falta de segurança, que se acabava por refletir na desconfiança do utente em relação à veracidade da informação que lhes estava a ser transmitida.

Esta dificuldade foi sendo superada com a ajuda e apoio de toda a equipa e também com a crescente confiança à medida que progredia no meu estágio.

Técnicas de comunicação

As técnicas para uma boa comunicação passam, entre outras, pela empatia, assertividade, boa postura, escuta ativa e simplicidade/eficácia na transmissão da informação.

Na fase inicial de atendimento ao público, o nervosismo, a inexperiência e o foco noutros fatores extras, nomeadamente, um foco extra no sistema Sifarma 2000[®], de forma a diminuir a probabilidade de ocorrência de erros, dificultaram a correta comunicação com o utente, ocorrendo muitas vezes lacunas na informação transmitida (as quais eram rapidamente corrigidas por toda a equipa, sempre atenta ao meu trabalho).

Com o decorrer do estágio, estas *soft skills* foram trabalhadas e melhoradas, contribuindo em muito para o meu crescimento a nível profissional.

3.3. Oportunidades

Equipa

A equipa da Farmácia Pastorinhos é composta por farmacêuticos, técnicos de farmácia e técnicos auxiliares. É uma equipa jovem, dinâmica e focada nos seus objetivos, valorizando o diferente *background* científico dos seus profissionais para a sua evolução conjunta. Destaca-se a simpatia, empatia e profissionalismo que transmitem aos utentes e que também me inculcaram durante o estágio.

Enquanto estagiária, fui muito bem-recebida, estando toda a equipa disponível para contribuir para a minha evolução e aprendizagem. Sempre prontos para esclarecer qualquer dúvida, foram fundamentais para o sucesso nas minhas tarefas tanto no *backoffice* como no atendimento ao balcão.

Presença de outro estagiário

Após o término do primeiro mês de estágio, uma nova estagiária juntou-se à equipa para realizar igualmente o seu estágio curricular do Mestrado Integrado em Ciências

Farmacêuticas. Esta foi uma oportunidade para partilhar dúvidas e também conhecimento, sempre com um espírito de ajuda nas tarefas e desafios com que nos fomos deparando.

Planeamento do estágio

O trabalho inicial no *backoffice* – reposição de produtos, verificação e introdução de encomendas, gestão de devoluções, etc. – proporcionou a familiarização inicial com os produtos da farmácia. Além disto, relativamente aos MSRM e OTCs, fui sendo motivada a pesquisar nas várias fontes disponíveis (Prontuário, Infomed e Sifarma 2000®) informação que permitisse esclarecer dúvidas e colmatar lacunas de conhecimento (3.2. Fraquezas).

Seguiu-se a familiarização com as instituições e lares com as quais a farmácia colabora e a realização de alguns atendimentos no *Farmadrive*. Este último foi importante uma vez que contribuiu para a realização dos primeiros atendimentos ao público sob menor pressão uma vez que, neste caso, se torna mais fácil o esclarecimento de dúvidas que me iam surgindo à cerca da medicação em si mesma e também à cerca do seu aconselhamento, permitindo uma menor descredibilização na frente do utente. Por fim, já mais confiante por todo o trabalho já realizado e conhecimentos adquiridos, foi-me depositada a confiança para realizar atendimento ao público.

Durante todo o estágio tive ainda a oportunidade de realizar testes de glicémia, colesterol total e medição da tensão arterial, o que permitiu o desenvolvimento de competências de aconselhamento farmacêutico e *soft skills*, tais como a empatia e assertividade, também fundamentais para o exercício da prática farmacêutica (3.2. Fraquezas).

Colaboração com lares e instituições

A colaboração com lares e instituições teve uma grande importância no desenrolar do estágio. Numa fase inicial, a dispensa de medicação foi realizada com supervisão, contribuindo para a familiarização com o Sifarma 2000®, nomeadamente no que diz respeito à dispensa de receitas e venda de outros produtos e atribuição de crédito.

Mais tarde, passei a realizar a separação da medicação pedida semanalmente pelas várias instituições. Nesta fase foi-me possível colocar em prática conhecimentos de farmacologia, uma vez que, quando se procede à dispensa, tem de se ter em atenção, não só a medicação habitualmente tomada pelos utentes, mas também as possíveis duplicações e interações. De facto, estas colaborações são importantes pelo volume de vendas que proporcionam e também pela dinâmica que permitem gerar na gestão de *stocks* e rotação de produtos.

Finalmente, realizei ainda a preparação da terapêutica em dois lares. Esta foi uma experiência que me permitiu verificar a complexidade e grande número da medicação tomada pela maioria dos utentes destas instituições. De notar que uma potencial revisão da medicação realizada em parceria com estas instituições poderia trazer um acréscimo de valor à Farmácia dos Pastorinhos (uma vez que ainda não se realiza) e também aos utentes polimedicados.

Organização dos produtos

Ainda que à primeira vista possa parecer um fator secundário, este foi um fator fundamental para o sucesso do estágio. A base desta consiste, primeiramente, no lema *first in, first out*, seguindo-se a organização dos MSRM por ordem alfabética da sua denominação comum internacional (DCI) e por forma farmacêutica. Esta organização intuitiva é uma ajuda fundamental para um atendimento adequado, uma vez que nos permite focar no utente em si. De notar que há determinadas exceções nesta organização relacionadas com a denominação de determinados medicamentos pelo Sifarma 2000®.

Com vista a uma melhor gestão de *stocks*, validades e produtos com menor rotatividade (os “monos”), foram criados expositores extra no *backoffice*, que me permitiram igualmente participar nesta tão importante vertente da gestão farmacêutica.

Elevado número de encomendas

A grande rotação de *stocks* gera, conseqüentemente, a receção de grande número de encomendas. Desta forma, foi-me possível familiarizar com a gestão financeira e rentabilidade da farmácia, nomeadamente no que diz respeito a margens aplicadas aos produtos, descontos acordados, entre outros pontos.

Sifarma 2000®

O Sifarma 2000® é a ferramenta de gestão e atendimento utilizado na Farmácia Pastorinhos. Ainda que deva ser sujeito a melhoramentos, esta plataforma é útil por permitir o rápido esclarecimento de dúvidas relacionadas com princípios ativos, indicações terapêuticas e posologia, ajudando a colmatar, mais uma vez, determinadas lacunas no conhecimento (3.2. Fraquezas).

Quando criada a ficha do utente, a plataforma permite a consulta da medicação habitual do utente (incluindo os respetivos laboratórios), o que facilita a dispensa de medicação a utentes habituais da farmácia e a criação do sentimento de confiança do utente

pelo estagiário, uma vez que por ser uma “nova cara” pode suscitar um sentimento de desconfiança inicial.

De notar que esta plataforma deveria ser sujeita a melhoramentos uma vez que esta não é intuitivo, necessitando de uma fase de adaptação inicial. As muitas janelas abertas durante o atendimento, muitas vezes desnecessária, e a dificuldade de consultar o histórico de vendas após iniciar a dispensa da receita são limitações acrescidas. Este sistema tem ainda o problema de, a partir de certo ponto, não permitir anular ou alterar a venda em curso, o que teria sido útil em várias ocasiões.

Formações

Enquanto estagiária tive oportunidade de participar em várias formações sobre variados produtos realizadas ao longo do período do estágio, tais como: formação de produtos de cosmética e proteção solar – formação da Isdin; produtos de bucodentária – formação da farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK); produtos de fitoterapia – formação “Arkoembaixador”; produtos de homeopatia – formação da Boiron; produtos de higiene íntima - formação da Saugella.

Estas mostraram-se essenciais para colmatar lacunas de conhecimento sobre produtos e áreas às quais não é dada ênfase durante a formação académica (3.2. Fraquezas), permitindo um melhor aconselhamento à cerca dos mesmos.

Realização de rastreios

No âmbito da celebração do “Mês do Coração” foram realizados rastreios gratuitos de glicémia, colesterol total e tensão arterial, dirigido a utentes sem e com patologias já identificadas. Como decorreu numa fase inicial do meu estágio, foi fundamental para, primeiramente, me permitir rever conceitos relacionados com esta matéria, não só em relação aos limites dos parâmetros bioquímicos e aconselhamento farmacêutico, mas também relativos ao esclarecimento de dúvidas, receios, mitos e aconselhamento não farmacológico, com a promoção de hábitos de vida saudáveis. Esta ação foi ainda importante para os primeiros passos na melhoria das minhas técnicas de comunicação (3.2. Fraquezas).

Manipulados

No decorrer do estágio curricular, tive a oportunidade de preparar vários medicamentos manipulados. Nomeadamente, pomada de vaselina salicilada, pomada de ácido salicílico e ureia, solução de ácido bórico à saturação, suspensão de trimetoprim a 1 %, e suspensão de espironolactona.

Desta forma, foi-me possível rever conceitos relativos à preparação das variadas formas galénicas, ao preenchimento de fichas de preparação galénica e de rótulos e rever os pontos relativos ao cálculo do preço dos manipulados.

Recolha de lotes de medicamentos

Ainda que a recolha de determinados lotes de medicamentos seja algo relativamente comum, durante o meu período de estágio o Infarmed emitiu uma circular informativa ordenando a recolha de variados lotes de medicamentos de diversos laboratórios contendo valsartan, na sequência da deteção de uma impureza na substância ativa valsartan produzida pelo fabricante Zhejiang Huahai Pharmaceuticals [7]. O grande número de lotes e laboratórios afetados, assim como a exposição mediática verificada, criaram uma situação pouco comum, suscitando diversas dúvidas tanto da parte dos utentes alarmados, que procuravam mais esclarecimentos junto da farmácia, como dos próprios farmacêuticos. De notar que à circular original, seguiu-se a emissão de mais dois aditamentos à mesma, com o esclarecimento de questões adicionais [8][9].

Esta situação permitiu-me contactar com mais uma vertente da farmácia comunitária, no que diz respeito ao esclarecimento e aconselhamentos dos utentes relativo a este tipo de situações e ao contacto com os vários procedimentos relativos à recolha dos produtos correspondentes aos vários lotes afetados.

3.4. Ameaças

Nomes comerciais

Como é compreensível, a formação académica a nível dos fármacos é feita, quase exclusivamente, recorrendo à Denominação Comum Internacional (DCI). No entanto, na prática diária em Farmácia Comunitária, o uso de designações comerciais é muito comum, sendo uma dificuldade inicial.

O constate contacto com estes medicamentos, contribuiu para a progressiva assimilação destas designações, acabando por me familiarizar com as mais usadas.

Colaboração com lares e instituições

Ainda que tenha contribuído para mais fácil aprendizagem à cerca de vários pontos (3.3 Oportunidades), o grande peso da colaboração da farmácia com lares e instituições, resultou na necessidade de dispêndio de uma grande parte do meu período de estágio nesta componente, tendo talvez contribuído para a iniciação mais tardia no atendimento ao público.

Horas de estágio

Uma vez que realizei mobilidade nos primeiros três meses de estágio, as horas de estágio de farmácia comunitária acabaram por ficar condensadas num menor período. Tal exigiu um maior esforço em termos físicos e diminuiu o tempo disponível para, por exemplo, poder realizar revisões de determinados conceitos lecionados fora do local de estágio.

Considero que por vezes o cansaço poderá ter afetado o meu desempenho, ainda que tenha tentado sempre minimizar e combater esta situação.

4. Exemplos de Casos Práticos

Caso 1

A utente X chega à farmácia e pede, especificamente, melatonina. Após algumas questões, verifico que a utente já tomou diazepam no passado para dormir. Questiono ainda se tem dificuldades em adormecer e se acorda durante o sono, ao que a utente responde afirmativamente.

Uma vez que demonstra dificuldades na indução e manutenção do sono, informo-a que a melatonina não será a solução mais indicada e indico soluções alternativas, nomeadamente um suplemento alimentar composto por extrato de passiflora (ação relaxante), melatonina (facilita a indução do sono) e extrato de papoila e melissa (diminui despertar noturno) ou um outro suplemento composto por melatonina, valeriana e passiflora.

A utente acede em levar a primeira sugestão.

Caso 2

A utente Y, no âmbito dos rastreios cardiovasculares realizados no âmbito do Mês do Coração, vem à farmácia medir a glicémia, colesterol e tensão arterial. A glicémia [10] e a tensão arterial [11] encontravam-se dentro dos limites considerados normais, contudo o colesterol total indicou valores alterados (270 mg/dl – alto) [12].

Devido ao valor alto registado, aconselhei-a a marcar uma consulta com o médico de forma a avaliar a necessidade de iniciar terapêutica medicamentosa para a dislipidemia. No entanto, a utente mostrou-se muito relutante em marcar a consulta e em tomar medicação. Perante a oposição, além do aconselhamento não farmacológico à cerca da alimentação e importância do exercício físico, sugeri a toma de um suplemento alimentar à base levedura vermelha de arroz, com monacolina k, ao que a utente acedeu. A monacolina K ajuda a reduzir os níveis de colesterol uma vez que apresenta um mecanismo de ação semelhante ao das tradicionais estatinas, devendo ser tomado à noite por forma a diminuir a produção endógena de colesterol [13].

Por fim, alertei para a necessidade de voltar a controlar os valores de colesterol após 1 mês, de modo a verificar o sucesso ou insucesso da medicação e das alterações ao estilo de vida. De notar que 1 mês depois a utente voltou à farmácia e desta vez o valor do colesterol total encontrava-se dentro dos níveis normais (160 mg/dl) [12] indicando o sucesso da terapêutica.

5. Conclusão

Após 4 meses de estágio, posso afirmar que esta é uma componente essencial do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, no que diz respeito à aplicação prática de conhecimentos teóricos com a sua respetiva consolidação e no preenchimento de lacunas na formação teórica em determinadas áreas.

Numa perspetiva de gestão, o estágio é fundamental para perceber a importância da gestão de *stocks*, de encomendas e de recursos humanos, e também da importância do marketing farmacêutico, no que diz respeito à organização e renovação de lineares e promoções/campanhas desenvolvidas.

No que diz respeito ao ato farmacêutico em si, o atendimento ao público, consequentemente aliado à dispensa de medicação e ao aconselhamento farmacêutico realizados durante o estágio, foi fundamental para a aquisição e desenvolvimento de técnicas de comunicação com o utente, com a consequente melhoria do aconselhamento prestado no ato da dispensa. Para tal, foi fundamental a disponibilidade e apoio prestados por toda a equipa, aliados ao meu interesse na aprendizagem. Destaco ainda a importância das várias formações que colmataram lacunas de conhecimento e da colaboração com lares que contribuíram para uma mais fácil adaptação à dispensa de medicação.

Ao passar da teoria à prática, foi possível perceber a real importância do farmacêutico na comunidade enquanto agente de saúde pública, uma vez que uma grande maioria dos utentes recorre às farmácias para obter um primeiro aconselhamento, de forma a evitar ter de se deslocar ao médico ou a outro profissional de saúde.

Considero ainda um privilégio ter tido a oportunidade de integrar a equipa da Farmácia Pastorinhos que me transmitiu os seus valores orientadores, nomeadamente, a importância atribuída à confiança dos seus clientes, à excelência dos seus profissionais e à inovação através da constante formação da sua equipa.

Por fim, saliento que a valorização do papel do farmacêutico na sociedade depende primeiramente dele mesmo e para tal deverá ter como mote orientadora, e passo a citar:

*"Servimos com paixão. Almejamos qualidade e excelência no nosso serviço,
todos os dias, cada vez mais."*

– Dr^a Natália Valinha, Grupo Sanches –

6. Bibliografia

1. ORDEM DOS FARMACÊUTICOS. **Código Deontológico da Ordem dos Farmacêuticos.** (1998) 1–9.
2. Faculdade de Farmácia - **Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.** Coimbra: Universidade de Coimbra 2018. [Consult. 21 de ago. 2018] Disponível em WWW: <http://www.uc.pt/ffuc/Ensino/micf>
3. **Lei n.º 74/2006 de 24 de março de 2006 da Assembleia da República.** [Em linha]. Diário da República: I série, n.º 60/2006 [Consult. 21 de ago. 2018]. Disponível em WWW: <https://dre.pt/web/guest/pesquisa/-/search/671387/details/maximized>
4. **Lei n.º 131/2015 de 4 de setembro de 2015** [Em linha]. Diário da República: I série, n.º 173/2015 [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: https://dre.pt/web/guest/home/-/dre/70186240/details/maximized?p_auth=a45KzwhS
5. QUAST, LISA - **How To Conduct A Personal SWOT Analysis** [Em linha]. Forbes, 15 abril 2013 [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: <https://www.forbes.com/sites/lisaquast/2013/04/15/how-to-conduct-a-personal-s-w-o-t-analysis/#3f846e1428d8>
6. FARMÁCIA DOS PASTORINHOS - **Farmácia dos Pastorinhos | Farmácias Grupo Sanches** [Em linha]. Farmácia dos Pastorinhos [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: <http://www.farmaciadospastorinhos.pt/pt/home>
7. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - Circular normativa n.º 096/CD/550.20.001. **Recolha de lotes de medicamentos contendo valsartan.** 04/07/2018. [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2409555/Recolha+de+lotes+de+medicamentos+contendo+valsartan/dcb07240-171e-4ab4-8c8e-4931b333f2b9>
8. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - Circular Informativa n.º 097/CD/550.20.001. **Aditamento à Circular Informativa N.º 096/CD/550.20.001, de 04-07-2018 - Recolha de lotes de medicamentos contendo Valsartan.** 05/07/2018. [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/2409555/Aditamento+Recolha+de+lotes+de+medicamentos+contendo+Valsartan/43d5fb2e-e9eb-4ed8-b2a2-46d84f407d19>
9. PORTUGAL. Direção-Geral da Saúde - Circular Informativa n.º 099/CD/550.20.001. **Aditamento às circulares informativas n. os 096 e 097/CD/550.20.001 Recolha de lotes de medicamentos contendo Valsartan.** 12/07/2018. [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/>

2409555/Aditamento+%C3%A0s+circulares+informativas+096+e+097++Recolha+de+lotes+de+medicamentos+contendo+Valsartan/f65abb3f-d95e-44f7-bf54-cbb0ea88642d

10. Norma 002/2011. 2011 - **Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus.**
DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE.
11. Norma 020/2011. 2013 - **Hipertensão Arterial: definição e classificação.**
DIREÇÃO GERAL DA SAÚDE.
12. Guidelines ATP III . 2001 - **ATP III Guidelines At-A-Glance Quick Desk Reference.** U.S.: NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH.
13. TILMAN. - **Cholesfytol** . [Em linha]. Tilman [Consult. 22 de ago. 2018]. Disponível em WWW: http://www.tilman.be/En/catalogue/cholesfytol_en

Parte II

Monografia

PREPARATION OF CHITOSAN NANOPARTICLES FOR INSULIN DELIVERY AND OTHER THERAPEUTIC AGENTS



FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA



**UNIVERSITÉ
DE GENÈVE**

FACULTÉ DES SCIENCES

Index

Index of figures.....	vii
Index of tables	vii
Abstract	17
Resumo.....	18
Abbreviations.....	19
Chapter 1 – General view	20
1.1 Chitosan – potential and versatility	20
1.2 Chitosan nanoparticles’ ionotropic gelation: general concepts.....	22
1.3 The factors that influence the chitosan nanoparticles characteristics	25
1.3.1 Chitosan molecular weight (MW).....	25
1.3.2 Degree of deacetylation.....	25
1.3.3 Chitosan concentration	25
1.3.4 Medium pH	26
1.3.5 TPP concentration.....	27
1.3.6 Stirring velocity	27
1.3.7 Medium temperature.....	28
1.3.8 Insulin concentration	28
1.3.9 Other factors	28
1.4 Insulin-loaded chitosan/TPP system.....	28
Chapter 2 – Preliminary experimental design.....	30
1. Materials.....	30
2. Methods	30
2.1 Chitosan purification.....	30
2.2 Chitosan nanoparticle production.....	30
2.3 Insulin’s encapsulation.....	32
2.4 Encapsulation efficiency	33
2.5 Nanoparticles characterization.....	33
2.6 Release studies	33
2.7 Stability studies.....	34
3. Results and discussion.....	34
4. Conclusion.....	40
5. Bibliography	41

Index of figures

FIGURE 1. CHITOSAN NANOPARTICLES PRODUCTION.....	31
FIGURE 2. SCHEME OF INSULIN ENCAPSULATION PROTOCOL	32
FIGURE 3. SEM RESULTS OF CHITOSAN NANOPARTICLES SOLUTION.....	37
FIGURE 4. STABILITY STUDIES WITH NANOPARTICLES PRODUCED WITH CS 75 % DDA GEN	38

Index of tables

TABLE 1. RESUME OF INSULIN CHITOSAN NANOPARTICLES PRODUCTION PROTOCOLS BY IONOTROPIC-GELATION METHOD	24
TABLE 2. SOP DATA OF NANOPARTICLE CHARACTERIZATION	33
TABLE 3. HPLC CONDITIONS TO INSULIN'S QUANTIFICATION.....	34
TABLE 4. CHITOSAN BATCHES USED.....	35
TABLE 5. CHITOSAN NANOPARTICLES CHARACTERISTICS. DATA SHOWS CHITOSAN DEPENDENCE ON ITS DDA AND THERE IS ALSO A GENERAL INCREASE ON SIZE AFTER MATURATION STEP	36
TABLE 6. CHITOSAN-INSULIN NANOPARTICLES' CHARACTERISTICS.....	39

Abstract

Chitosan is one of the most well-studied biopolymer. However, due to the innumerable contradictory information that appears in the literature, a lot of work has yet to be done in order to clarify it. Particularly, it would be necessary to establish a connection between chitosan and chitosan particles characteristics (deacetylation degree, molecular weight and size of the particles) to its final proprieties, namely, immunostimulant activity.

This research work aimed to prove the reproducibility of chitosan nanoparticles' production protocol through ionotropic-gelation and to establish a method to efficiently encapsulate insulin into those nanoparticles.

Based on the similar results of chitosan nanoparticle size and zeta potential obtained in two different laboratories (Coimbra, Portugal and Geneva, Switzerland), we could conclude that we obtained a reproducible protocol.

Insulin-loaded nanoparticle size and zeta potential results, when compared with the results of the unloaded particles, lead us to set the hypothesis that part of encapsulated insulin was lost in the final process step because there is a decrease in nanoparticle size and a decrease in zeta potential. However, this could not be proved due to difficulties in insulin quantification technique and to the short time we had to solve them.

Keywords: chitosan, ionotropic-gelation, TPP, nanoparticles, insulin, encapsulation.

Resumo

O quitosano é um dos biopolímeros mais bem estudados. Contudo, devido à numerosa informação contraditória que se verifica na literatura, um grande trabalho ainda tem de ser realizado no que diz respeito ao estabelecimento de uma correlação entre as características do quitosano e das partículas de quitosano (grau de deacetilação, peso molecular e tamanho das partículas) com as suas propriedades finais, mais especificamente, a sua atividade imunoestimulante.

Este trabalho de pesquisa visa provar a reprodutibilidade do protocolo de produção de nanopartículas de quitosano através de gelificação ionotrópica e estabelecer um método para a eficiente encapsulação de insulina nessas mesmas nanopartículas.

Com base nos resultados similares do tamanho e potencial zeta das nanopartículas de quitosano obtidos em dois laboratórios diferentes (Coimbra, Portugal e Genebra, Suíça), podemos concluir que obtivemos um protocolo reprodutível.

O tamanho e potencial zeta das nanopartículas encapsuladas com insulina, quando comparados com as partículas não encapsuladas, permitem-nos estabelecer a hipótese de que há uma perda parcial de insulina na fase final do processo uma vez que se verifica a diminuição do tamanho e do potencial zeta das nanopartículas. Contudo, estes resultados não puderam ser provados devido às dificuldades na quantificação da insulina e devido ao curto espaço de tempo disponível para resolver estas dificuldades.

Palavras-chave: quitosano, gelificação ionotrópica, TPP, nanopartículas, insulina, encapsulação.

Abbreviations

CAM – Chorioallantoic membrane assay

Cs-Ins NPs – insulin loaded chitosan nanoparticles

DDA – degree of deacetylation

DLS – dynamic light scattering

DNA – deoxyribonucleic acid

EE – encapsulation efficiency

ELS – electrophoretic light scattering

HCl – hydrogen chloride

HMWC – high molecular weight chitosan

HPLC – high performance liquid chromatography

HTCC – N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride

LMWC – low molecular weight chitosan

MMWC – medium molecular weight chitosan

MW – molecular weight

NaOH – sodium hydroxide

NP – nanoparticle

PDI – polydispersity index

pI – isoelectric point

rHi – recombinant human insulin

RT – room temperature

SEM – scanning electron microscopy

SOP – Standard Operating Procedure (SOP)

TEER – Transepithelial electrical resistance

TCs – Thiomalyl chitosan

TPP – sodium tripolyphosphate

Chapter I – General view

NANOBIOMAT is a European Project which aims “to implement the safe-by-design concept on the design of nanostructured bioactive materials for biomedical applications. The Project concept is to bring together research groups specialized in material science and experts in bio-active materials and their application in medicine.” [14].

The goal of the experimental work, reported on this monograph and developed in Geneva, was to investigate the reproducibility of the chitosan nanoparticle preparation method established by Coimbra’s group. A second objective was to establish the insulin encapsulation method into the nanoparticles (NPs) (insulin was chosen as a model of protein drug). Both objectives contributed for the obtainment of the well characterized chitosan nanoparticles that would be tested (immunotoxicity studies) by members of the project.

Notice that the final purpose of this project is to define the immunotoxicology profile of the different chitosan nanoparticles. By doing that, it will be possible to establish the characteristics of different types of chitosan nanoparticles, establish a correlation between chitosan characteristics and its immunostimulant activity and, finally, to establish a guideline which allows to select the best chitosan according to its purpose, – whether it is or not convenient to stimulate the immune system – allowing a safe-by-design approach.

1.1 Chitosan – potential and versatility

Chitosan is the partially deacetylated chitin, a poly (D-glucosamin), a family of linear polymers differing in polymer length and deacetylation degree. The polymer is composed of randomly distributed β -(1→4)-linked D-glucosamin (deacetylated unit) and N-acetyl-D-glucosamine (acetylated unit) and appear in market with different purity degrees [15]. The chitin is a natural biopolymer extracted from the exoskeleton of crustaceans (shrimp, crabs, lobsters, etc.) and from the cell walls of fungi or yeast [15][16][17][18][19].

In fact, chitosan is one of the most well-studied biopolymers. This polysaccharide is exceptionally versatile as it can be used in solutions, hydrogels and/or nanoparticles. Moreover, it is possible to proceed to chemical functionalization of chitosan polymer in its amino and hydroxyl groups, and/or to conjugate peptides and other molecules to the polymer backbone in order to modify its physicochemical proprieties and/or to introduce desirable characteristics and further broadening the chitosan’s potential applications - for example, by targeting tissues, improving system stability in harsh conditions, etc [20][21].

Additionally, chitosan is well known for its inherent biological properties, namely biocompatibility [22], non-toxicity [17][23], antimicrobial activity [17], plant strengthening [21], hydrating ability [18][21], gel and film forming [21], mucoadhesive properties [17][23][24], immunostimulant activity [24], hemocompatibility [17], and biodegradability [23][24]. Consequently, this polymer is one of the most widely used for biomedical applications.

Actually, chitosan has been under investigation for drug delivery [18], gene delivery [25], surgical sutures [18], rebuilding of bone [18], corneal contact lenses [18], dental implants [18], wound healing [18][20], antimicrobial applications [20], tissues engineering [20] and vaccine delivery [20]. Chitosan is also approved for dietary applications in Japan, Italy, and Finland [24].

One of the major applications of chitosan is related with the preparation of particles (micro and nano). Nanoparticles of natural polymers are a promising approach for drug delivery due to their biocompatibility and biodegradability, as well as for the ability to provide controlled drug release [23].

Since it was first applied to produce chitosan-gel nanospheres by an emulsion/reticulation process in 1994 [26], a lot of different particle preparation processes have been explored using this polymer, such as emulsion-droplet coalescence, emulsion, solvent diffusion, solvent evaporation, reverse micellization, reverse emulsion, desolvation, and electrostatic complexation [17].

However, when it comes to drug delivery systems, safety and non-toxic effect are the most important requisites for both carrier and reagents used in its preparation [24]. Thus, electrostatic complexation method in aqueous medium, avoiding organic solvents, high temperatures and high shear rates complies safety and low toxicity [23][17]. This method is based on the simple electrostatic interaction between polymers and other molecules with opposite charge. In case of chitosan nanoparticle preparation, these characteristics along with the cationic sites available all along the polymer chain of chitosan (due to amino groups' protonation in acidic medium) make it possible to interact and to successfully encapsulate fragile poly-anionic molecules, such as proteins, DNA, and phospholipids, producing stable colloidal objects [17][21][24].

Moreover, concerning the presence of macromolecules, a precipitation salt or a cross-linker, electrostatic complexation method can be subdivided in polyelectronic complexation, precipitation/coacervation and ionotropic-gelation, respectively [16][17][20].

Firstly, polyelectronic complexation refers to systems produced from the simple interaction between an electrically charged polymer, such as positively charged chitosan, and

a negatively charged macromolecule, like alginate, dextran sulfate, deoxyribonucleic acid (DNA), and insulin [27][28].

Secondly, the precipitation/coacervation technique of chitosan-based system takes advantage of chitosan insolubility in alkaline medium. By blowing the alkaline solution of precipitant salt (sodium sulfate, sodium citrate, sodium hydroxide, sodium phosphate, etc) through an infusion pump into chitosan solution, chitosan precipitates forming coacervate droplets. Note that it could be necessary the addition of a stabilizer [20].

Finally, the ionotropic gelation method simply uses a charged polymer – cationic chitosan – and a non-toxic anionic cross-linking agent species, such as citrate, sulfate or polyphosphate. This technique, particularly by using sodium triphosphate (TPP) as a crosslinker to chitosan nanoparticles, is by far the most mentioned in the literature. In fact, this method of production was selected by our team, that is why, from now on, we are going to focus on the ionotropic gelation method.

The potential application of chitosan/TPP nanoparticles comprises encapsulation of macromolecules, hydrophobic and hydrophilic macromolecules. Consequently, these systems are able to incorporate a large panel of drugs [17].

As a matter of fact, the ionotropic gelation process is particularly keen to incorporate hydrophilic drugs, once they can be easily solubilized into chitosan or TPP solutions. Accordingly, to incorporate hydrophobic drugs, other strategies have to be applied, such as developing an “oil in water” emulsion before gelation with TPP, precomplexing drugs with cyclodextrins or even solubilizing drugs in a compatible organic solvent miscible with water, before chitosan’s complexation with TPP. Notice that this organic solvent will be easily removed by centrifugation steps with water [17].

Finally, about macromolecules encapsulation, proteins have been extensively studied in what concerns to ionotropic gelation to develop a system for oral delivery, which should be able to protect proteins from harsh conditions of the gastrointestinal tract, like acidic gastric medium and enzyme degradation [17].

1.2 Chitosan nanoparticles’ ionotropic gelation: general concepts

In general, preparation of chitosan-insulin nanoparticles by ionotropic gelation consists in to dissolve chitosan in aqueous acetic acid solution, while TPP is dissolved in deionized water. Then, TPP solution is added dropwise to the chitosan solution under stirring (magnetic stirring or with a high-speed homogenizer), leading to the spontaneous formation of chitosan nanoparticles.

About the insulin incorporation, there are many different protocols. Insulin can be simply pre-dissolved in diluted hydrogen chloride (HCl) solution [28], the pH of this final solution can be adjusted with sodium hydroxide (NaOH) [30][31], or insulin can even be directly solubilized into diluted NaOH or directly to TPP solution [32]. Then, insulin solution can be added to chitosan solution right before or during TPP addition [22][33][34][35] or added after TPP addition to chitosan [23][29]. Nanoparticles form spontaneously, and, afterward, the system gets under stirring for a while in order to stabilize the nanoparticles.

Despite similar formulation and preparation procedures, different properties have been reported about the insulin-loaded chitosan nanoparticles (Cs-Ins NPs) [29], resumed in **Table I**. Factors such as chitosan and TPP concentrations, pH, chitosan origin and its characteristics, rotation speed, insulin concentration, among others, greatly influence the characteristics of the final nanoparticles, thus having a serious impact on batch reproducibility and bioactivity [21][29].

TABLE I. RESUME OF INSULIN CHITOSAN NANOPARTICLES PRODUCTION PROTOCOLS BY IONOTROPIC-GELATION METHOD

System	Insulin	Chitosan	Preparation method		NP characterization		Insulin EE %	Testes in vitro		Testes in vivo		Delivery route	Ref
			Chitosan solution	Insulin solution	Crosslink solution	Size		Potential Zeta (mV)	Cytotoxicity assay	Bio compatibility	Anti-insulin IgG		
Cs NPs	Porcine pancreas insulin, Sigma Chemical	1.86x10 ⁵ MW; 85 % DDA Aldrich Chemicals	8 mL chitosan 0.2 % (w/v) (in acetic acid)	Insulin in 0.05 M HCl premixed with TPP or chitosan solution	4 mL TPP solution 0.1 % (w/v)	237 nm to 253 nm	2 % to 85 %	---	---	---	---	Oral	[29]
Cs NPs	27.6 IU/mg Xuzhou biochemical plant	MW? 88.9 % DDA Shenyang Pharmaceutical University, China	4 mL chitosan 2.6 mg/mL (in acetic acid)	Premixed with TPP solution	Volume? TPP solution 0.30 mg/mL	265 nm	26 %	---	---	---	---	Oral	[36]
Cs NPs	Porcine pancreas insulin 27.8 USP/mg, Sigma Chemicals	186 kDa; 85 % DDA Aldrich Chemical, Milwaukee	8 mL chitosan 0.2 % (w/v) (in acetic acid)	Insulin in 0.01 M HCl premixed with TPP solution	4 mL TPP solution 0.1 % (w/v) In 0.05 M NaOH	269 nm	38 %	---	---	---	---	---	[34]
Cs NPs	Novolin R ^o , 100 IU/mL	MW?; DDA? Low viscosity chitosan	Volume?; chitosan 0.4 % (w/v) (in 1% (v/v) acetic acid)	Premixed with TPP solution	4 mL TPP solution 0.1 % (w/v) In 0.075 M NaOH	339 nm	78 %	---	---	---	---	---	[35]
Cs NPs	Bovine pancreas insulin (27 US U/mg) Sigma-Aldrich, USA	200 kDa; DDA? Sigma-Aldrich, USA	Volume? 0.2 % (w/v) chitosan (in acetic acid)	Insulin 0.05 % (w/v) in TPP solution	Volume? TPP solution 0.05 % (w/v)	215 nm	49 %	---	---	---	---	---	[22]
Cs NPs	Crystalline recombinant human insulin Novo Nordisk, Denmark	LMWC 95 % DDA Primex, Iceland	10 mL chitosan 1 and 3 mg/mL (in acetic acid 1 %)	Cs:TPP → 4:1	Volume? TPP solution 0.1 % (w/v)	313 nm	69 %	---	---	---	---	---	[35]
Cs NPs	Human recombinant insulin 100 IU/mL, USP, Mumbai	70 kDa; 85 % DDA Central Institute of Fisheries Technology	20 mL thiomaly chitosan 1% (in water)	Diffusion filling process	2 mL TPP solution 0.5% (w/w)	364 nm	57 %	Viability > 80% (MTT assay)	---	---	---	Oral	[37]
Cs NPs	Zinc-free human insulin Sigma-Aldrich, Missouri	LMWC 150 kDa; DDA? Sigma-Aldrich, Missouri	Volume? chitosan 2.5 mg/mL (in 0.05 % (v/v) acetic acid)	Premixed with TPP solution	Volume? TPP solution 0.25 mg/mL CS:TPP → 5:1	330 nm	55 %	---	No death or inflammatory response (CAM assay in fertilized chicken eggs)	---	---	---	[24]
Cs NPs	27.5 IU/mg Jiangsu Wangbang Bio-Technology	400 kDa; DDA? Haxin Biological Product	Volume? 50 mg chitosan (1% (v/v) acetic acid)	Insulin in NaOH (0.01 mg/mL), premixed with chitosan solution	3 mL TPP solution 0.5 mg/mL	91 nm to 220 nm	93 %	---	---	---	---	Oral	[32]
HTCC	Human recombinant insulin Sigma-Aldrich	80-140 kDa; 75-85% DDA Sigma-Aldrich	15 mL HTCC-33% 1-2.5 mg/mL (in water)	Insulin dissolved in 0.1 N HCl; the pH was increased to 8.0 with NaOH and premixed with TPP solution	7mL TPP solution 0.06%	142 nm	52 %	---	---	---	---	---	[31]
TCs-TPP NPs	Human Insulin (400 U/ml)	70 kDa; 85 % DDA Central Institute of Fisheries Technology	20 mL thiomaly chitosan 1% (in water)	Diffusion filling process	2 mL TPP solution 0.5% (w/w)	364 nm	57 %	Viability > 80% (MTT assay)	---	---	---	Oral	[37]
Cs NPs into transdermal patch	Pure insulin powder Sigma-Aldrich	LMWC; DDA? Sigma-Aldrich	Volume? chitosan 0.1 to 0.2 % (2% acetic acid)	Premixed with chitosan solution	Volume? TPP solution 0.25 %	465 nm to 661 nm	77 % to 79 %	---	---	---	---	Transdermal	[38]
Cs-TPP-micro emulsion	Recombinant human insulin 100 IU/mL Eli Lilly and Company (USA)	MMWC; 75-85 % DDA Sigma-Aldrich (USA)	Volume? chitosan 0.3 % (w/v) (in 0.3% (v/v) acetic acid)	Insulin added to solution after NPs formation	Volume? TPP solution 0.1 % (w/v)	149 to 402 nm*	---	Viability depend on concentration (XTT assay)	---	---	---	Oral	[23]

*data from Cs-TPP NPs

1.3 The factors that influence the chitosan nanoparticles characteristics

1.3.1 Chitosan molecular weight (MW)

Chitosan is a family of functional biopolymers with different degrees of deacetylation (DDA) (40-98%) and different molecular weight (10 - 2 000 kDa) [21][33].

By decreasing chitosan's MW, the particle size also tends to decrease, due to shorter polymer chains. However, further reduction of the MW can reverse this trend, once some studies show that NPs' size can increase [39]. Besides that, low molecular weight chitosan (LMWC) has been preferred to high molecular weight chitosan (HMWC) for drug delivery because LMWC shows better solubility and even less toxicity than HMWC [40].

Furthermore, studies show that encapsulation efficiency (EE) is greatly affected by chitosan's MW. In fact, in case of NPs produced with LMWC and HMWC, EE decreases with increasing amount of insulin concentration. HMWC has longer fragments and higher viscosity, while LMWC has shorter fragments, but, for both, the length of its fragments restricts the ionic interaction with TPP and insulin. However, it seems that chitosan with medium molecular weight (MMWC) allows higher incorporation of the drug, because EE increases with increasing amount of insulin concentration [33].

Molecular weight can also determine chitosan NPs' stability over the time. This is due to the interaction of free polymer chains with the NP's network. leading to the increase of the NPs' size over the time. Moreover, larger NPs (prepared with chitosan of higher MW) usually have more intermolecular entanglements and hydrogen bindings, meaning that they produce stable NPs, with fewer changes over time [24].

1.3.2 Degree of deacetylation

Some authors claim that deacetylation's degree is the second most important factor that influences chitosan/TPP NPs [21]. In fact, higher DDA leads to smaller and denser nanoparticles [41], because there are more amino functional groups available in the chitosan polymer chain to react with TPP [40].

1.3.3 Chitosan concentration

Chitosan concentration strongly influences the NPs' size. Actually, results show that NPs size increase with increasing chitosan concentration [21][40]. However, this effect also depends on DDA once it is claimed that very low (< 50%) or very high DDA (> 80%) give less control over chitosan's concentration into NPs' final characteristics [21].

Furthermore, Fan *et al.* [40] says that there is a correlation between chitosan concentration and the mass ratio of chitosan to TPP. Namely, for low chitosan concentration, it is possible to form stable NPs at a low mass ratio, while for higher chitosan concentrations it is necessary to increase the chitosan:TPP ratio to obtain stable NPs [40].

Moreover, chitosan concentration has no effect on EE, but, according to Kouchak *et al.* [33], it increases the zeta potential of formulations [33]. However, we believe that zeta potential has a greater dependence on the amount of TPP, as it is discussed at point 1.3.5.

1.3.4 Medium pH

Medium pH is one of the most important factors, as it can influence the amount of protein incorporated, chitosan conformation and its reaction with the tripolyphosphate anions [29]. Furthermore, pH also has a significant effect on the chemical and conformational stability of insulin, directly influencing its interaction with TPP and chitosan.

Furthermore, studies show that increasing the final pH of formulation from 2.3 to 6.1 do not significantly enlarge the size of nanoparticles, but it can increase the number of particles formed. In addition, apparent pKa of chitosan is about 6.5, which means that chitosan goes from a cationic species at pH 2.3 to a neutral polymer at pH 6.5, and, finally, to an anionic species, at higher pH, due to amino groups' deprotonation. Note that chitosan nanoparticles start to agglomerate followed by precipitation, as long as pH increases [29].

Another point is that the best medium pH, right before TPP addition, seems to be in the range of pH 4.7-4.8. That is because it will lead to NPs with a unimodal size distribution. Thus, the excess of acid is usually neutralized with NaOH prior to TPP addition [40].

Furthermore, decreasing medium pH leads to the decrease of the mass ratio of chitosan to TPP needed to obtain a stable suspension [40].

In what concerns to insulin association efficiency, it seems that the optimal pH is 6.1. This is due to more efficient adsorption of proteins onto polymers at pH around the former isoelectric point (pI), which is 5.3. At pI, the electrostatic repulsion is minimized, increasing conformational stability while specific surface area decreases.

Moreover, as said above, chitosan as an apparent pKa of 6.5. Thus, chitosan and insulin will have opposite charges between pH 5.3 and 6.5, and, because of that, the positively charged chitosan (due to amino groups protonation), and the negatively charged insulin will interact.

However, at insulin's pI the intermolecular interactions are more labile, contributing to an easy dissociation when loaded NPs are diluted in aqueous media. In contrast, at pH 5.3 there is a stronger association efficiency between the peptide and chitosan, which results in a better release profile [32][34].

Another key point is the pH influence in chitosan-TPP interaction. At pH 5.3, due to higher chitosan protonation, the polymer establishes more interactions with TPP, resulting in smaller insulin-loaded NPs than those produced at pH 6.1 [34].

All things considered, it is considered that there is a better system's performance at pH 5.3 instead of pH 6.1 [32][34].

1.3.5 TPP concentration

TPP anions can bind the positively charged chitosan and insulin into an electrostatically stabilized chitosan-TPP-insulin complex. This decreases the formation of partially unfolded insulin, which, otherwise, will self-aggregate into a critical nucleus and then into fibrils [29].

Furthermore, increasing amounts of TPP are known to increase nanoparticles' size, to promote nanoparticles aggregation, and, finally, to increment precipitation for higher TPP concentrations [24][31][40]. Increasing TPP amount also leads to the zeta potential decrease due to neutralization of protonated amino groups of chitosan [40]. Besides that, some state that an increase in polyanion ration can increase the yield of NPs [22].

1.3.6 Stirring velocity

It is known that nanoparticles' systems have a high tendency to aggregate. Actually, if the mechanical energy associated with the reaction's stirring speed exceeds the electrostatic repulsion between nanoparticles, they start to aggregate. Therefore, studies show that nanoparticle's size highly depends on stirring velocity [42].

Fàbregas *et al.* [42] state that, in a range of 500 rpm to 900 rpm, it is produced smaller particles for medium stirring speeds (700 rpm and 800 rpm). In this study, it was also observed that better yield values are obtained for medium stirring speed, while this factor seems not to influence nanoparticles' zeta potential.

Furthermore, it has also been shown that stirring contributes to aggregation of small particles, leading to a more stable and homogeneous nanoparticles population [24].

1.3.7 Medium temperature

In what concerns to temperature, it seems that particles' size tends to decrease with the increase of temperature, in the range of 10 °C to 60 °C. The increase of temperature improves the NPs' polydispersity index (PDI) as well. This is explained by the higher chain flexibility and by the decrease of the specific volume of chitosan's molecule, which promotes the formation of a compact structure [40].

1.3.8 Insulin concentration

Insulin entrapment into chitosan NPs increases NPs' size, due to competition with TPP (both negatively charged) to positive amino groups of the polymer backbone [24]. Additionally, increasing insulin's amount leads to the slight enlargement of NPs, to the decrease of their surface charge and to the enhancement of their loading capacity [29][43].

1.3.9 Other factors

The presence of salts in medium (ionic strength) can also influence chitosan NPs' characteristics. Actually, high ionic strength, due to high acetic acid concentration, leads to the increase of PDI of the NPs. This is due to the decrease of available cross-linking points in chitosan polymer to be accessed by TPP [40].

Furthermore, reaction time and rate of TPP addition, do not significantly affect NPs' characteristics [42].

Finally, it was mention above that there are different details among chitosan/TPP NPs preparation and insulin loading protocols (**Table I**). Despite that, it seems that adding insulin either to chitosan solution or to TPP solution do not greatly affect the characteristics of chitosan-insulin nanoparticles (CS-Ins NPs) [29].

1.4 Insulin-loaded chitosan/TPP system

Association between chitosan and insulin depends mostly on electrostatic interactions among acidic insulin groups and the amino groups of chitosan. However, other mechanisms such as hydrogen bonding and hydrophobic interactions can also be involved in the process [36][43]. Accordingly, *in vitro* release shows that insulin rapidly dissolves in aqueous solution, which suggests that insulin simple dissociates from the ionic complex insulin-chitosan due to their labile interaction [29][36][43].

Initial burst release followed by a little-sustained release of insulin is transversal between the great majority of papers that have studied these systems [29][32][33][44]. The

burst release happens due to insulin adsorbed on top of nanoparticles [33], which is easily dissolved into the solution. Note that, the insulin adsorption is supported by decrease of NPs' zeta potential after peptide's incorporation when compared to naked chitosan nanoparticles - negatively charged proteins reduce the total net charge of the system [24].

Besides that, insulin sustained release depends on protein entrapped into chitosan matrix, that will be released along with the formation of a porous structure through the chitosan-insulin system due to its continuous dissolution and erosion [32]. Another key point is the chitosan deprotonation in intestinal medium, creating ionic repulsion between the polymer chains, which allows insulin release [30].

Moreover, *in vivo* studies show that for oral administration of Cs-Ins NPs there is absorption of NPs and it is possible to achieve a sustained reduction of glycemia for more than 8 h when compared to subcutaneous insulin administration [34][36]. Once again, it is proved the great potential of Cs-Ins NPs.

Another key point is the immunostimulant activity of chitosan, as it can stimulate the immune response in the absence of the antigen [45]. Actually, chitosan/TPP nanoparticles have already been used for vaccine delivery, where they have shown high antibody titers of IgG [46]. With this in mind and knowing that it is not clear how chitosan characteristics relate with its immunostimulant activity, it would be interesting to understand if there is, or not, insulin-specific IgG induction. Even though that, in general, this is not the final goal of the of this system, the fact is that according to **Table I**, there is still no data about the immune response to Cs-Ins NPs administration.

Chapter 2 - Preliminary experimental design

I. Materials

Chitosan of 75 % and 88 % degree of deacetylation (DDA) purified in Coimbra, Portugal, was purchased to Primex (batches TM4570 and TM4847, respectively) as well the chitosan of 75 % DDA (TM4570) and chitosan 96.3 % DDA (TM4779) purified in Geneva Switzerland. The sodium triphosphate pentabasic was obtained from FLUKA. For encapsulation and release studies, we used recombinant Human insulin (rHi) (from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*) purchased from Sigma.

2. Methods

2.1 Chitosan purification

Chitosan was purified following the method established by Coimbra's team. It consisted in dissolving 1 g of chitosan in 10 mL NaOH 1M. Then, chitosan solution was under stirring for 3 h at a temperature between 40 °C and 50 °C, filtered using a Buchner funnel with a paper filter, and the chitosan was washed with 20 mL of Milli-Q water (or pyrogen-free water).

The recovered chitosan was solubilized in 200 mL of acetic acid solution 1 % and it was left under stirring for 3 h at room temperature. Then, the solution was filtered through a paper filter and the pH of the filtrate was adjusted to pH 8 with NaOH 1M.

Finally, the filtrate was centrifuged 30 min at 4500 g. Then, the precipitated chitosan was washed with deionized water (or pyrogen-free water) three times and it was recovered by freeze-drying.

2.2 Chitosan nanoparticle production

For NPs' production and maturation, we used the IKA® T25 digital Ultra-Turrax with the S25N-10G dispersing element and a glass tube (30 mm diameter). The concentration of the NPs was performed using Vivaspin 20 mL centrifugal concentrator (MWCO 300 kDa).

Firstly, the protocol consisted in preparing acetic acid 1 % (v/v) and TPP solution of 0.16 % (w/v). Then, chitosan was added to the acetic acid solution and its pH adjusted to 4.6-4.8 with 10 N NaOH. The final concentration of chitosan should be 0.1 % (w/v). Both chitosan and TPP solutions were filtered through a 0.22 µm filter to a new tube.

Secondly, to 10 mL of chitosan solution was added drop by drop 1750 μ L of TPP solution, under high-speed homogenization at 24 000 rpm. Chitosan NPs were formed spontaneously.

Finally, the suspension was matured with a high-speed homogenizer at 24 000 rpm, for 30 min (in an ice bath). From the NPs' suspension, it is taken a 500 μ L sample to analyze.

The obtained chitosan NPs suspension was centrifuged at 3000 g, for 50 min, at room temperature (RT) in a Vivaspin 20 centrifugal concentrator (MWCO 300 KD). It was obtained approximately 5 mL of NPs suspension, then this step was repeated until less than 1 mL was recovered in the centrifugation tube (Vivaspin).

Finally, the suspension was washed twice in purified water. For this step, the suspension was diluted with purified water (until complete 10 mL in Vivaspin tube) and centrifuged at 3000 g, for 50 min at RT. After the second wash, the centrifugations were repeated until less than 1 mL was recovered in the Vivaspin tube (**Figure 1**).

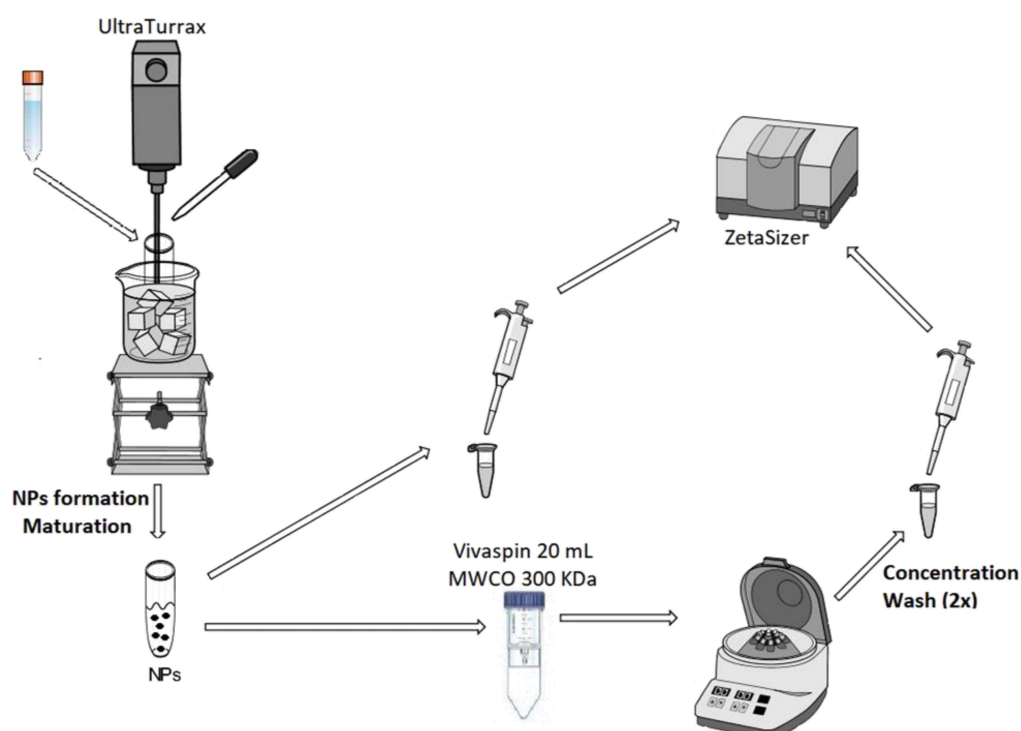


FIGURE 1. CHITOSAN NANOPARTICLES PRODUCTION

2.3 Insulin's encapsulation

In order to proceed to insulin's encapsulation, the protocol established above to chitosan NPs production was adapted, based on diverse literature reports [23][36][47].

Firstly, a stock solution of insulin 2 mg/mL was prepared in acetic acid 1 % (v/v). Then, 100 mg of insulin was dissolved into 50 mL of acetic acid 1 % (v/v), and 10 mg of chitosan 75 % DDA (purified in Geneva) was dissolved in 4 mL of acetic acid solution 1 % (v/v). All the solutions were filtered through a 0.22 μm filter to a new tube.

Finally, 6 mL of insulin 2 mg/mL was added drop by drop to 4 mL of chitosan solution under stirring, using a high-speed homogenizer at 11 000 rpm. The final suspension was left under stirring for another 30 min (in an ice bath). The final concentration of chitosan should be 0.1 % (w/v) and insulin:chitosan ratio should be 6:5 (w/w).

After adjusting pH of chitosan/insulin solution to 4.6-4.8 with 10 N NaOH, TPP solution (1750 μL) was added drop-by-drop to 10 mL of chitosan/insulin solution, using a high-speed homogenizer at 11 000 rpm. CS-Ins NPs formed spontaneously. The suspension was matured with a high-speed homogenizer at 11 000 rpm, for 30 min (in an ice bath). From the NPs' suspension, it was collected a 500 μL sample to analyze.

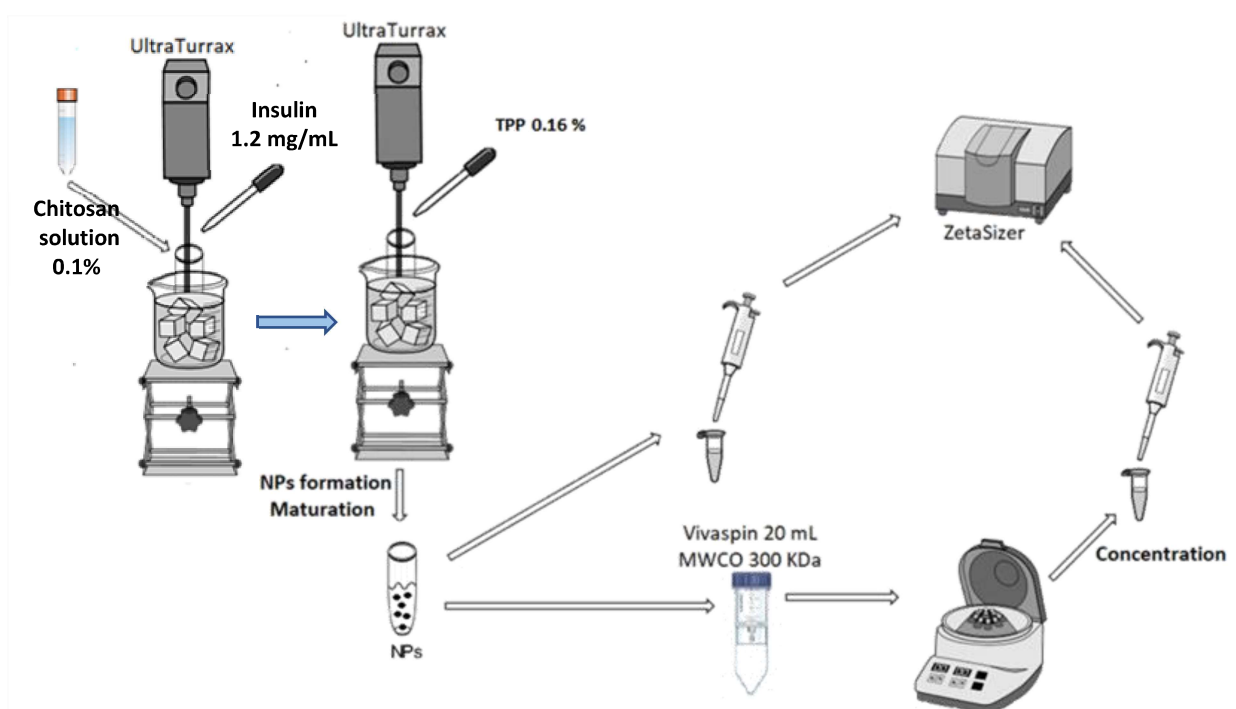


FIGURE 2. SCHEME OF INSULIN ENCAPSULATION PROTOCOL

Finally, the NPs suspension was concentrated by centrifugation at 3000 g, for 50 min at 4 °C, in a Vivaspin 20 centrifugal concentrator (MWCO 300 KD). It was obtained

approximately 5 mL of NPs suspension, thus the centrifugation step was repeated until less than 1 mL was recovered in the centrifugation tube (Vivaspin). 1 mL sample of precipitate was collected in an Eppendorf tube (stock solution) and the supernatant was also kept at 4 °C.

2.4 Encapsulation efficiency

The insulin EE before and after centrifugation was calculated following the formula:

$$EE (\%) = \frac{C_i - C_s}{C_i} \times 100$$

where C_i is the initial drug concentration in chitosan solution and C_s is the concentration of the free drug after maturation or after centrifugation (supernatant's concentration).

2.5 Nanoparticles characterization

Measurements of particle size and zeta potential were determined by ZetaSizer NanoZS, Malvern, Software Zetasizer version 7.11. To create the Standard Operating Procedure (SOP) we used the following information in **Table 2**.

TABLE 2. SOP DATA OF NANOPARTICLE CHARACTERIZATION

Material	Chitosan	Refractive index	Absorption	
		1.590	0.001	
Dispersant	Water	Refractive index	Viscosity	Temperature
		1.330	0.8872 cP	25 °C
Data processing	General Purpose (normal resolution)			

In all cases, 100 µL of sample was diluted into a final volume of 1 mL and sonicated at high voltage (1 min) before measuring each sample by ZetaSizer.

2.6 Release studies

In order to establish the release profile of Cs-Ins NPs, 1 mL of loaded NPs was added to 20 mL of PBS solution at room temperature, under magnetic stirring. Samples were collected at times 0, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 120, 240, 360 and 480 min (notice that the volume was replaced by new medium). To quantify the insulin, we used standards of 0.001, 0.01, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75 and 1.20 mg/mL concentrations, which were prepared in PBS.

High performance liquid chromatography (HPLC) for insulin's quantification followed the conditions described on (Table 3).

TABLE 3. HPLC CONDITIONS TO INSULIN'S QUANTIFICATION

Column	RP-C18, 100 x 4.6 mm, 3 µm particle size
Mobile phase	Potassium phosphate buffer pH 3 / Acetonitrile (73/27) %
Elution mode	Isocratic
Flow rate	1 mL/min
Column Oven Temp	15 °C
Detector	Photodiode Array Detector, model Waters 996
Wavelength	213.46 and 227.57 nm
Retention time	
Injection Volume	20 µL

2.7 Stability studies

In other to do the stability studies of naked chitosan NPs, 100 µL of chitosan NPs (after centrifugation) was diluted into a final volume of 1 mL with either MiliQ water or trehalose 1 % solution. Then, these samples were freeze-dried and kept at 4 °C for 2 weeks. Samples were resuspended in MiliQ water and characterized by dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS).

3. Results and discussion

The aim of this experimental work, developed in Geneva, was to prove the reproducibility of the chitosan nanoparticle production method established by Coimbra's group and, then, to establish the insulin's encapsulation method into the NPs.

Firstly, the objectives of purification of raw chitosan were to remove proteins that can be trapped into chitosan structure, and to eliminate lipopolysaccharides (LPS). As a matter of fact, after following the protocol established in Coimbra, we obtained chitosan as a fluffy powder for both batches.

After few adjustments, like establishing the speed of the magnetic stirring during the maturation step and establishing the speed of homogenization when tripolyphosphate (TPP) is added to the chitosan solution, which were not clear in the original protocol, we obtained

the protocol for Chitosan Nanoparticle Production that produced similar size particles to the ones obtained by Coimbra's group (~100 nm).

Furthermore, we used chitosan with 75 % and 88 % of degree of deacetylation (DDA), purified both in Coimbra and Geneva (**Table 4**). Notice that we have received in Geneva a new batch of chitosan 96.3 % DDA (TM4779). This means that chitosan purified in Geneva, which was supposed to have 88 % DDA, had an extra variation factor that can influence the NPs' characteristics, when compared to NPs produced from chitosan purified in Coimbra. That why this batch will not be mention in this monograph.

TABLE 4. CHITOSAN BATCHES USED

Chitosan 75 % DDA		Chitosan 88 % DDA	
Coimbra	Batch TM4570	Coimbra	Batch TM4847
Geneva			

Chitosan NPs were characterized by dynamic light scattering (DLS), electrophoretic light scattering (ELS) and scanning electron microscopy (SEM). The results obtained are summarized, for both chitosan 75 % DDA and 88 % DDA in **Table 5**.

NPs produced with chitosan 75 % DDA before centrifugation were about 117 nm and 107 nm (from chitosan purified in Coimbra and Geneva respectively). After centrifugation, NPs were about 240 nm and 170 nm (from chitosan purified in Coimbra and Geneva respectively).

Moreover, NPs produced from chitosan 88 % DDA purified in Coimbra where about 173 nm after maturation and 385 nm after centrifugation. As a matter of fact, there is always an increase in NPs' size after centrifugation, because of the contribution of this step to aggregates' formation.

It is interesting to notice that even though literature states that, in general, chitosan NPs tend to decrease their size for higher chitosan DDA [39][48][41], data from this experiment shows the opposite. There is an increase in chitosan NPs' size along with chitosan DDA increase, for example, before centrifugation, mean particles size of Cs 75 % DDA PORT and Cs 88 % DDA PORT are 117.7 nm and 173.3 nm, respectively (**Table 5**).

Having these results, we proceeded to the next step to analyze the data from DLS. All chitosan NPs, produced from the different batches, were around 100 nm. However, we could observe as well big aggregates, which increases the final size average of the NPs'.

Moreover, SEM (**Figure 3**) supports this information because we can always observe multiple populations of NPs.

TABLE 5. CHITOSAN NANOPARTICLES CHARACTERISTICS. DATA SHOWS CHITOSAN DEPENDENCE ON ITS DDA AND THERE IS ALSO A GENERAL INCREASE ON SIZE AFTER MATURATION STEP

		Before nanoparticles centrifugation			After nanoparticles centrifugation			
Chitosan sample	n	Size (nm) ± SD	PDI	Zeta potential (mV) ± SD	Size (nm) ± SD	PDI	Zeta potential (mV) ± SD	
Cs 75 % DDA	Purified Cs 75 % DDA PORT TM4570	3	117.7 ± 2.2	0.3	28.9 ± 1.0	204.1 ± 2.4	0.4	48.1 ± 1.2
	Purified Cs 75 % DDA GEN TM4570	3	106.9 ± 1.2	0.3	27.7 ± 0.7	170.6 ± 1.5	0.3	47.2 ± 0.9
	Coimbra's team results	3	102.2 ± 17.4	0.3	-	127.0 ± 9.0	0.3	29.0 ± 2.5
Cs 88 % DDA	Purified Cs 88 % DDA PORT TM4847	3	173.3 ± 4.0	0.3	34.3 ± 0.8	384.5 ± 31.2	0.5	53.1 ± 0.7
	Coimbra's team results	3	135.6 ± 8.9	0.2	-	276.1 ± 31.8	0.3	43.1 ± 2.1

Legend:

Purified Cs 75 % DDA PORT TM4570 - Purified chitosan 75 % degree of deacetylation, batch TM4570 (purified in Coimbra, Portugal)

Purified Cs 75 % DDA GEN TM4570 - Purified chitosan 75 % degree of deacetylation, batch TM4570 (purified in Geneva, Switzerland)

Purified Cs 88 % DDA PORT TM4847 - Purified chitosan 88 % degree of deacetylation, batch TM4847 (purified in Coimbra, Portugal)

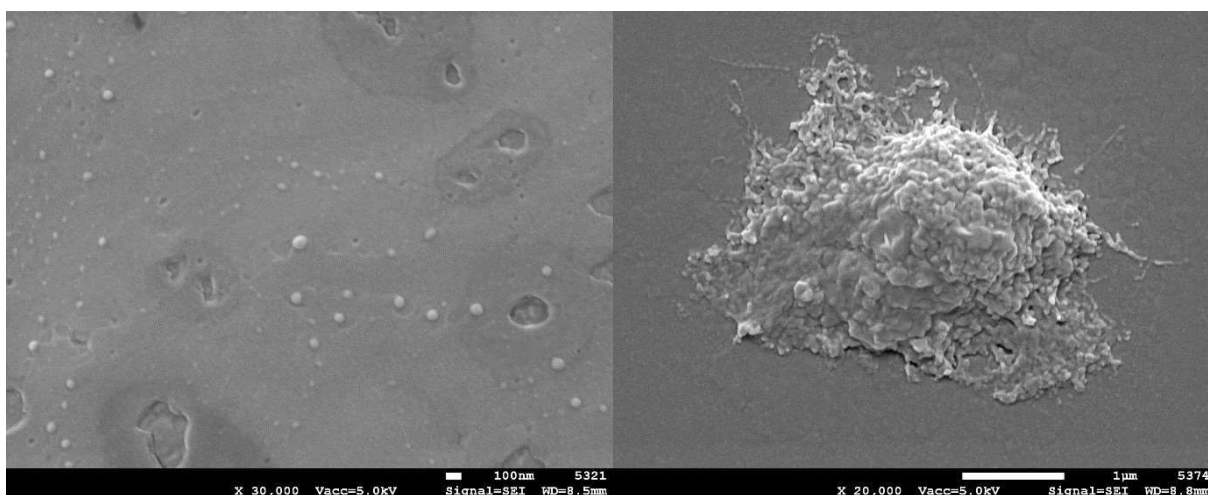


Figure 3. SEM results of chitosan nanoparticles solution

Another key point is the stability of NPs. Even though some studies show that chitosan NPs can have a good stability at RT for several days [40], in general, NPs prepared by ionotropic gelation are usually characterized by aggregation immediately after preparation or by limited physical and chemical stability when suspensions are stored for long time.

Therefore, drying techniques such as lyophilization have been applied to ensure the long-term conservation of polymeric NPs. This method implies the use of a lyo/cryoprotective agent before freezing, such as trehalose. This sugar interacts with the polymer particles via hydrogen bonding, maintaining the polymer of the nanoparticles in a “pseudo hydrated” state during the dehydration step, due to sugars’ ability to remain amorphous during freeze-drying. Besides that, trehalose has its own special features such as low hygroscopicity, an absence of internal hydrogen bonds, a very low chemical reactivity, and a higher glass transition temperature [24].

In this experiment, we could observe that NPs were not stable in water, because they start to form big aggregates over a short period of time, which explains the need to sonicate the samples before DLS measurements. Thus, in order to study the stability of NPs during storage, we freeze-dried NPs after centrifugation in water and in trehalose 1 % and we kept them at 4 °C for 2 weeks. It was expected that trehalose would act in this case as a cryo-protectant, improving the long-term storage stability of chitosan/TPP nanoparticles [40]. Afterwards, we re-suspended NPs in water and measured their size and zeta potential.

First, we confirmed that NPs were not stable in water, because it was not possible to obtain NPs with the same size after resuspension in water of lyophilized NPs.

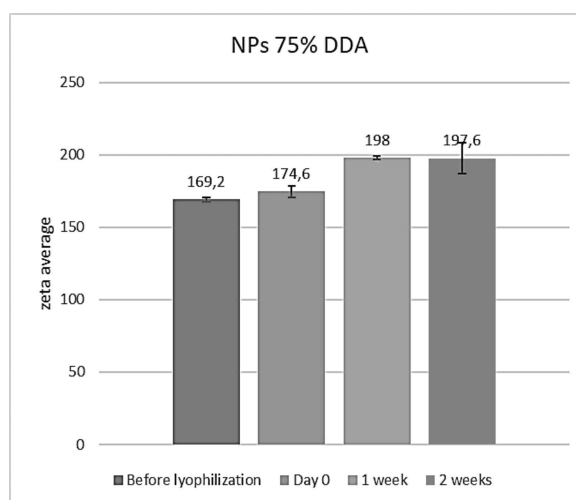


FIGURE 4. STABILITY STUDIES WITH NANOPARTICLES PRODUCED WITH Cs 75 % DDA GEN

Then, we could see that lyophilized NPs based on chitosan 75 % DDA are stable in trehalose 1 % for at least 2 weeks, because no significant increase in size could be seen (**Figure 4**). However, more studies are required to conclude whether the NPs produced, are, or not more stable with trehalose 1 %.

The second part of our work consisted in establish a protocol for insulin encapsulation into chitosan NPs, where the insulin is the protein drug model. After checking the literature, we decided to encapsulate recombinant human insulin [23][49][50]. Even though the rHi is produced by recombinant DNA technology in baker's yeast, it is identical in function and structure to the native human sequence [51].

Firstly, we established the encapsulation protocol for protein, based on both the original protocol to chitosan nanoparticles production and on the literature [23][36][47]. Note that it was decided to proceed to insulin's encapsulation with only chitosan 75 % DDA purified in Geneva.

After the encapsulation, loaded NPs were characterized after maturation and after centrifugation steps by DLS and ELS (**Table 6**), together with the calculation of both EE and release profile.

For Cs-Ins NPs production, *stock* solutions of 2 mg/mL insulin in acetic acid 1 % (v/v) were prepared and stored in a freezer. In this protocol, the *stock* solution of insulin was added to the chitosan solution already dissolved in acetic acid, to obtain a final working solution of chitosan-insulin in acetic acid 1 % (finally, 1.2 mg/mL of insulin and 0.1 % w/v of chitosan).

TABLE 6. CHITOSAN-INSULIN NANOPARTICLES' CHARACTERISTICS

Chitosan-insulin sample	n	Before nanoparticles centrifugation			After nanoparticles centrifugation		
		Size (nm) ± SD	PDI	Zeta potential (mV) ± SD	Size (nm) ± SD	PDI	Zeta potential (mV) ± SD
1 NPs Cs-Ins 75% DDA	3	135.6 ± 3.9	0.4	26.3 ± 0.8	105.2 ± 1.2	0.3	30.9 ± 1.1
2 NPs Cs-Ins 75% DDA	3	139.5 ± 2.8	0.4	25.4 ± 1.6	101.5 ± 1.2	0.3	31.5 ± 1.2
3 NPs Cs-Ins 75% DDA	3	112.2 ± 3.4	0.4	23.6 ± 1.6	88.7 ± 1.0	0.3	27.7 ± 0.8
Average		129.1 ± 3.3	0.4	25.1 ± 1.3	98.5 ± 1.1	0.3	30.0 ± 1.0
Naked CS NPs	3	111.5 ± 2.0	0.3	29.4 ± 0.6	192.3 ± 1.8	0.4	47.6 ± 1.1

Note:

Naked CS NPs – Data from nanoparticles obtained from purified chitosan 75 % DDA, batch TM4570 (purified in Geneva, Switzerland)

Then, TPP solution was added to this final chitosan-insulin solution, but the stirring velocity was decreased to 11 000 rpm, to keep the insulin's integrity. The collected samples were kept in the freezer until HPLC quantification.

A slight increase in size before centrifugation was detected for all analyzed samples when compared to the naked NPs (129 nm vs 111.5 nm, respectively) as expected (**Table 6**) [24][35]. However, after centrifugation, there is a decrease in size to 98.5 nm for Cs-Ins NPs, which can be related with insulin's surfactant activity. The insulin not encapsulated stabilizes the suspension due to its positive and negative groups, decreasing aggregation, and, thus decreasing the NPs size. Besides that, we cannot exclude the influence of decreased stirring velocity during maturation over the NPs sizes, when compared to the naked ones.

Furthermore, even though it was expected the zeta potential to decrease due to insulin adsorption on nanoparticles surface, there is a slight increase in zeta potential of Cs-Ins NPs before centrifugation when compared to the naked ones [35]. On the contrary, after centrifugation, there is a slight decrease in zeta potential, compared to the naked chitosan nanoparticles.

About the insulin quantification by HPLC, it was not possible to establish a good calibration curve, that is why the data from EE % and release profile will not be shown. The experience would have to be repeated with better conditions for insulin quantification by HPLC or, maybe, with another quantification method.

4. Conclusion

It is known that the final characteristics and biological properties of chitosan NPs are highly dependent on the physicochemical parameters, on the chitin's origin, on chitin extraction process and on the chitosan obtantion process (deacetylation of the chitin [17]. Actually, the main drawback of chitosan nanoparticle production is the lack of reproducibility in its characteristics due to poor understanding of production protocol [21]. In this experiment we could observe how chitosan's DDA can affect NPs' characteristics and the importance of the complete characterization of chitosan batches, because small differences can result in NPs with different characteristics . Moreover , we were able to prove the reproducibility of the Coimbra 's team protocol , once we could obtain NPs with similar characteristics , and we could also observe that trehalose is a potential NPs' suspension preservative.

Furthermore, we could see that there are some differences between the insulin's encapsulation protocols already established in the literature, which make it more difficult to compare the different Cs-Ins NPs characteristics obtained among papers. Due to the short time period of this trainee at Geneve laboratory, we were not able to establish a successful encapsulation protocol for insulin. It will need some modifications on protocol and in the insulin's quantification method. It will also be interesting to do a study of the conformational stability of insulin after encapsulation to prove that the production method allows proteins to maintain its biological activity.

Moreover, after going through the numerous research papers, the final aim of this project gets even more important. Even though it is well known that chitosan has immunostimulant activity, there is no information about Cs-Ins NPs' effect on the immune system. It is still not clear if there is or not insulin-specific IgG induction, which would, certainly, compromise the future application of Cs-Ins systems, once, in general, the immune response is not desirable.

5. Bibliography

14. UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ. **Final Report Summary - NANOBIOMAT (Nanostructured Biocompatible/Bioactive Materials)**. [In line] Poland: CORDIS. [Accessed on 1st August 2018]. Available at WWW: cordis.europa.eu/result/rcn/238011_en.html
15. PRIMEX. **History of Chitin | Primex**. [In line] Primex. [Accessed on 1st August 2018]. Available at WWW: www.primex.is/quality-and-environment/history-of-chitin/
16. MUKHOPADHYAY, P., SARKAR, K., CHAKRABORTY, M., BHATTACHARYA, S., MISHRA, R., KUNDU, P. P. **Oral insulin delivery by self-assembled chitosan nanoparticles: In vitro and in vivo studies in diabetic animal model**. *Mater. Sci. Eng. C* 33, (2013) 376–382.
17. BUGNICOURT, L., LADAVIÈRE, C. **Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications**. *Prog. Polym. Sci.* 60, (2016) 1–17.
18. JAFARY OMID, N., BAHARI JAVAN, N., DEHPOUR, A.-R., PARTOAZAR, A., RAFIEE TEHRANI, M., DORKOOSH, F. **In-vitro and in-vivo cytotoxicity and efficacy evaluation of novel glycyl-glycine and alanyl-alanine conjugates of chitosan and trimethyl chitosan nanoparticles as carriers for oral insulin delivery**. *Int. J. Pharm.* 535, (2018) 293–307.
19. ELGADIR, M. A., UDDIN, M. S., FERDOSH, S., ADAM, A., CHOWDHURY, A. J. K., SARKER, M. Z. I. **Impact of chitosan composites and chitosan nanoparticle composites on various drug delivery systems: A review**. *J. Food Drug Anal.* 23, (2015) 619–629.
20. KOPPOLU, B. P., SMITH, S. G., RAVINDRANATHAN, S., JAYANTHI, S., SURESH KUMAR, T. K., ZAHAROFF, D. A. **Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery**. *Biomaterials* 35, (2014) 4382–9.
21. SREEKUMAR, S., GOYCOOLEA, F. M., MOERSCHBACHER, B. M., RIVERA-RODRIGUEZ, G. R. **Parameters influencing the size of chitosan-TPP nano- and microparticles**. *Sci. Rep.* 8, (2018) 4695.
22. MAKHLOF, A., TOZUKA, Y., TAKEUCHI, H. **Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery**. *Eur. J. Pharm. Sci.* 42, (2011) 445–451.
23. EREL, G., KOTMAKÇI, M., AKBABA, H., SÖZER KARADAĞLI, S., KANTARCI, A. G. **Nanoencapsulated chitosan nanoparticles in emulsion-based oral delivery**

- system: In vitro and in vivo evaluation of insulin loaded formulation.** *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 36, (2016) 161–167.
24. RAMPINO, A., BORGOGNA, M., BLASI, P., BELLICH, B., CESÀRO, A. **Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability.** *Int. J. Pharm.* 455, (2013) 219–228.
 25. GAN, Q., WANG, T., COCHRANE, C., MCCARRON, P. **Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan–TPP nanoparticles intended for gene delivery.** *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 44, (2005) 65–73.
 26. OHYA, Y., TAKEI, T., KOBAYASHI, H., OUCHI, T. **Release behaviour of 5-fluorouracil from chitosan-gel microspheres immobilizing 5-fluorouracil derivative coated with polysaccharides and their cell specific recognition.** *J. Microencapsul.* 10, (1993) 1–9.
 27. MAHJUB, R., DORKOOSH, F. A., AMINI, M., KHOSHAYAND, M. R., RAFIEE-TEHRANI, M. **Preparation, Statistical Optimization, and In vitro Characterization of Insulin Nanoparticles Composed of Quaternized Aromatic Derivatives of Chitosan.** *AAPS PharmSciTech* 12, (2011) 1407–1419.
 28. ABBAD, S., ZHANG, Z., WADDAD, A. Y., MUNYENDO, W. L. L., LV, H., ZHOU, J. **Chitosan-Modified Cationic Amino Acid Nanoparticles as a Novel Oral Delivery System for Insulin.** *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, (2015) 486–499.
 29. MA, Z., YEOH, H. H., LIM, L. **Formulation pH modulates the interaction of insulin with chitosan nanoparticles.** *J. Pharm. Sci.* 91, (2002) 1396–1404.
 30. LI, L., JIANG, G., YU, W., LIU, D., CHEN, H., LIU, Y., TONG, Z., KONG, X., YAO, J. **Preparation of chitosan-based multifunctional nanocarriers overcoming multiple barriers for oral delivery of insulin.** *Mater. Sci. Eng. C* 70, (2017) 278–286.
 31. HECQ, J., SIEPMANN, F., SIEPMANN, J., AMIGHI, K., GOOLE, J. **Development and evaluation of chitosan and chitosan derivative nanoparticles containing insulin for oral administration.** *Drug Dev. Ind. Pharm.* 41, (2015) 2037–2044.
 32. ZHAO, L., SU, C., ZHU, B., JIA, Y. **Development and optimization of insulin-chitosan nanoparticles.** *Trop. J. Pharm. Res.* 13, (2014) 3–8.
 33. KOUCHAK, M., AVADI, M., ABBASPOUR, M., JAHANGIRI, A., BOLDAJI, S. K., HISTORY, A. **Effect of different molecular weights of chitosan on preparation and characterization of insulin loaded nanoparticles by ion gelation method.** *Int. J. Drug Dev. Res.* 4, (2012) 271–277.
 34. MA, Z., LIM, T. M., LIM, L.-Y. **Pharmacological activity of peroral chitosan-**

- insulin nanoparticles in diabetic rats.** *Int. J. Pharm.* 293, (2005) 271–280.
35. AZEVEDO, J. R., SIZILIO, R. H., BRITO, M. B., COSTA, A. M. B., SERAFINI, M. R., ARAÚJO, A. A. S., SANTOS, M. R. V., LIRA, A. A. M., NUNES, R. S. **Physical and chemical characterization insulin-loaded chitosan-TPP nanoparticles.** *J. Therm. Anal. Calorim.* 106, (2011) 685–689.
36. PAN, Y., LI, Y., ZHAO, H., ZHENG, J., XU, H. **Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo.** 249, (2002) 139–147.
37. REKHA, M. R., SHARMA, C. P. **Simultaneous Effect of Thiolation and Carboxylation of Chitosan Particles Towards Mucoadhesive Oral Insulin Delivery Applications: An In Vitro and In Vivo Evaluation.** *J. Biomed. Nanotechnol.* 11, (2015) 165–176.
38. PRAKASH FRANCIS, A., SADHASIVAM, L., DEY, N., DEVASENA, T. **Transdermal patches of chitosan nanoparticles for insulin delivery.** *Artic. Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* (2015).
39. HUANG, M., KHOR, E., LIM, L.-Y. **Uptake and Cytotoxicity of Chitosan Molecules and Nanoparticles: Effects of Molecular Weight and Degree of Deacetylation.** *Pharm. Res.* 21, (2004) 344–353.
40. FAN, W., YAN, W., XU, Z., NI, H. **Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique.** *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 90, (2012) 21–27.
41. ZHANG, H., OH, M., ALLEN, C., KUMACHEVA, E. **Monodisperse Chitosan Nanoparticles for Mucosal Drug Delivery.** *Biomacromolecules* 5, (2004) 2461–2468.
42. FÀBREGAS, A., MIÑARRO, M., GARCÍA-MONTOYA, E., PÉREZ-LOZANO, P., CARRILLO, C., SARRATE, R., SÁNCHEZ, N., TICÓ, J. R., SUÑÉ-NEGRE, J. M. **Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan–tripolyphosphate nanoparticles.** *Int. J. Pharm.* 446, (2013) 199–204.
43. FERNÁNDEZ-URRUSUNO, R., CALVO, P., REMUÑÁN-LÓPEZ, C., VILA-JATO, J. L., ALONSO, M. J. **Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles.** *Pharmaceutical Research* 16, (1999) 1576–1581.
44. PAN, Y., LI, Y., ZHAO, H., ZHENG, J., XU, H., WEI, G., HAO, J., CUI, F. **Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo.** *Int. J. Pharm.* 249, (2002) 139–147.

45. DES RIEUX, A., FIEVEZ, V., GARINOT, M., SCHNEIDER, Y.-J., PRÉAT, V. **Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach.** *J. Control. Release* 116, (2006) 1–27.
46. CHEN, F., ZHANG, Z.-R., YUAN, F., QIN, X., WANG, M., HUANG, Y. **In vitro and in vivo study of N-trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery.** *Int. J. Pharm.* 349, (2008) 226–233.
47. SADEGHI, A. M. M., DORKOOSH, F. A., AVADI, M. R., SAADAT, P., RAFIEE-TEHRANI, M., JUNGINGER, H. E. **Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods.** *Int. J. Pharm.* 355, (2008) 299–306.
48. GASPAR, V. M., SOUSA, F., QUEIROZ, J. A., CORREIA, I. J. **Formulation of chitosan–TPP–pDNA nanocapsules for gene therapy applications.** *Nanotechnology* 22, (2011) 015101.
49. LIU, Y., LIU, L., ZHOU, C., XIA, X. **Self-assembled lecithin/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery: preparation and functional evaluation.** *Int. J. Nanomedicine* 11, (2016) 761.
50. SAHOO, P., LEONG, K. H., NYAMATHULLA, S., ONUKI, Y., TAKAYAMA, K., CHUNG, L. Y. **Optimization of pH-responsive carboxymethylated iota-carrageenan/chitosan nanoparticles for oral insulin delivery using response surface methodology.** *React. Funct. Polym.* 119, (2017) 145–155.
51. Sigma-Aldrich. **Insulin, Human Recombinant dry powder, for research or for further manufacturing use** [In line] Portugal: Sigma-Aldrich. [Accessed on 10th August 2018] Available at WWW: sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/91077c?lang=pt®ion=PT