



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Rita Mariana Alves Henriques

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin derivatives” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos, da Dra. Maria Teresa Murta e da Dra. Elisabete Alves apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019

Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Rita Mariana Alves Henriques

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin derivatives” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob a orientação da Professora Doutora Sónia Alexandra Pinto Ribeiro Silva Santos, da Dra. Maria Teresa Murta e da Dra. Elisabete Alves apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Setembro de 2019



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Eu, Rita Mariana Alves Henriques, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n° 2014198846, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin derivatives” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

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

Coimbra, 2 de setembro de 2019.



(Rita Mariana Alves Henriques)

*“O sucesso é a soma de pequenos esforços repetidos diariamente.”*

Robert Collier

## Agradecimentos

À Professora Doutora Sónia Silva Santos, pelas inúmeras horas disponibilizadas no laboratório, por todo o conhecimento transmitido e pelas palavras amigas que em muito contribuíram para ultrapassar qualquer crise existencial. Obrigada por me ter ensinado que, para não encararmos a Ciência com frustração, é essencial equilibrar as perguntas constantes com a aceitação da incerteza.

À Professora Doutora Teresa Cruz, à Doutora Célia Cabral e ao Doutor Paulo Matafome, pelo apoio e dicas prestadas no decorrer das atividades laboratoriais.

À Sara Oliveira e à Tamaeh Monteiro, por terem acompanhado de perto todas as experiências e contribuído para a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Teresa Murta, à Dra. Rita Gaspar e a toda a equipa do departamento de QP&C, pela aprendizagem, amizade e boa disposição constante.

À Dra. Elisabete Alves, ao Dr. José Ganilho e à equipa técnica da Farmácia Alves, por me terem facultado a melhor experiência possível em Farmácia Comunitária, pela disponibilidade para o esclarecimento das minhas incalculáveis dúvidas e pelas grandes amizades construídas, que levarei sempre comigo.

Aos meus amigos – Paula Santos, Raquel Tavares, Nuno Canoeiro, Sofia Fragoso, Andreia Cardoso, Juliana Ribeiro, Ana Ribeiro, Mariana Rocha e aos demais aqui não enumerados –, pela cumplicidade, pela presença nos melhores momentos e pelo apoio nos piores. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao Hugo, por todo o amor, compreensão, incentivo e ternura. Obrigada por seres o meu porto de abrigo e por me mostrares que a maior dificuldade será sempre um desafio superável.

Aos meus pais, porque o meu percurso académico só foi possível graças a eles. Obrigada por acreditarem cegamente no meu potencial mesmo quando eu duvido.

Por último, mas não menos importante, um eterno agradecimento aos meus anjos da guarda, por me terem transmitido os valores que a sociedade tem vindo a perder, pela motivação nos estudos e por me guiarem através do vosso brilho, todas as noites, no céu.

# ÍNDICE

<b>EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF CURCUMIN DERIVATIVES .....</b>	<b>iv</b>
<b>Index of Figures .....</b>	<b>v</b>
<b>Index of Tables.....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vi</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>vii</b>
<b>Abbreviations.....</b>	<b>viii</b>
<b>1. Introduction .....</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes: understanding the basis .....	1
1.2. Therapeutic options.....	3
1.3. Natural compounds: is curcumin an option?.....	4
1.4. Studies performed.....	6
1.5. Existing patents .....	8
<b>2. Objectives.....</b>	<b>10</b>
<b>3. Materials and methods .....</b>	<b>11</b>
3.1. Curcumin derivatives .....	11
3.2. Reagents .....	11
3.3. Evaluation of hypoglycemic activity.....	12
3.3.1. Animal model .....	12
3.3.2. Insulin Tolerance Test.....	13
3.4. Evaluation of cytotoxicity .....	13
3.4.1. Cell culture and materials .....	13
3.4.2. Alamar Blue assay.....	13
3.5. Evaluation of anti-inflammatory activity .....	14
3.5.1. Cell culture and materials .....	14
3.5.2. Griess assay.....	15
3.6. Evaluation of antioxidant activity.....	16
3.7. Statistical analysis.....	16
<b>4. Results .....</b>	<b>17</b>
4.1. Evaluation of hypoglycemic activity.....	17
4.2. Evaluation of cytotoxicity .....	18
4.2.1. Effect of curcumin and its derivatives on RAW 264.7 cell line viability .....	18
4.2.2. Effect of curcumin and its derivatives on COS-7 cell line viability .....	19
4.3. Evaluation of anti-inflammatory activity .....	20
4.4. Evaluation of antioxidant activity.....	20

<b>5. Discussion</b> .....	22
<b>6. Conclusion and future perspectives</b> .....	26
<b>7. References</b> .....	x

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA ..... xiv**

<b>Abreviaturas</b> .....	xv
<b>1. Introdução</b> .....	27
<b>2. Bluepharma</b> .....	28
2.1. Departamento de QP&C .....	28
<b>3. Análise SWOT</b> .....	29
3.1. Pontos Fortes .....	29
3.2. Pontos Fracos .....	31
3.3. Oportunidades .....	32
3.4. Ameaças .....	34
<b>4. Conclusão</b> .....	35
<b>5. Bibliografia</b> .....	xvi
<b>Anexos</b> .....	xvii

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA ..... xxi**

<b>Abreviaturas</b> .....	xxii
<b>1. Introdução</b> .....	36
<b>2. Farmácia Alves</b> .....	37
<b>3. Análise SWOT</b> .....	38
3.1. Pontos Fortes .....	38
3.2. Pontos Fracos .....	40
3.3. Oportunidades .....	41
3.4. Ameaças .....	43
<b>4. Casos Práticos</b> .....	44
<b>5. Conclusão</b> .....	45
<b>6. Bibliografia</b> .....	xxiii
<b>Anexos</b> .....	xxiv

**EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY AND  
ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF CURCUMIN DERIVATIVES**





## INDEX OF FIGURES

Figure 1 - Mechanisms of action of a) curcumin in the b) pancreatic $\beta$ -cells, c) liver, d) skeletal muscle and e) white adipose tissue. As it can be observed, this compound has an impact on the glucose and lipid metabolism, oxidative stress and inflammation. (Adapted from WOJCIK <i>et al.</i> , 2018).....	5
Figure 2 - Impact of curcumin and derivatives 20 and 27 on weight gain in GK rats, a non-obese animal model of T2D. (A) Weight gain expressed as a percentage of baseline weight. (B) Initial (day 0) and final (day 3) body weight expressed as g. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of 2-4 animals per group. ....	17
Figure 3 - ITT results after a three-day administration of curcumin and derivatives 20 and 27 in GK rats, a non-obese animal model of T2D. (A) ITT curve expressed as a percentage of baseline glycemia. (B) Fold change of glycemia. (C) Area under the curve (AUC) of the ITT for each group measured in mg/dL $\times$ h. Results are expressed as mean $\pm$ SEM of 2-4 animals per group. ....	18
Figure 4 - Effect of curcumin and derivatives 20 and 27 on murine macrophage cell line RAW 264.7 viability (Alamar Blue Assay). Results are expressed as a percentage of resazurin reduction by control cells maintained in culture medium in the presence of vehicle. Each value represents the mean $\pm$ SEM from three experiments, performed in duplicate (** <i>p</i> <0.001, compared to vehicle; ### <i>p</i> <0.001, compared to curcumin and derivative 20). ....	19
Figure 5 - Effect of curcumin and derivatives 20 and 27 on fibroblast-like cell line COS-7 viability (Alamar Blue Assay). Results are expressed as a percentage of resazurin reduction by control cells maintained in culture medium in the presence of vehicle. Each value represents the mean $\pm$ SEM from three experiments, performed in triplicate. ....	19
Figure 6 - Effect of curcumin and derivatives 20 and 27 on NO production in murine macrophage cell line RAW 264.7 (Griess Assay). Results are expressed as a percentage of nitrite production by cells cultured in the presence of LPS. Each value represents the mean $\pm$ SEM from three experiments, performed in duplicate ( <i>p</i> <0.05, compared to LPS; ** <i>p</i> <0.001, compared to LPS; ### <i>p</i> <0.001, compared to LPS+Vehicle). ....	20

## INDEX OF TABLES

Table 1 - Treatment of T2D.....	3
Table 2 - Short list of five patents regarding “Curcumin” AND “Diabetes” search phrase in the Website Espacenet.....	8
Table 3 - Compound’s name, structure, molecular formula and molecular weight .....	11
Table 4 - Antioxidant index (%) of BHT, curcumin and its derivatives, in different concentrations using TBARS assay in the absence or presence of ABAP.....	21

## ABSTRACT

Currently, type 2 diabetes mellitus is one of the major public health problems. Although the list of antidiabetic drugs is extent, the truth is therapeutic goals are not fully accomplished. Additionally, some adverse effects may provoke a low adherence to therapy, which is the driving force for the investigation of new antidiabetic drugs.

Our interest in curcumin is due to the traditional use of *Curcuma longa* rhizome in India and China to treat diabetes. Besides, several studies have demonstrated that curcumin and its derivatives show a wide range of biological effects, such as antioxidant, anti-inflammatory and immunomodulatory activities. Thus, the aim of this pilot study was to evaluate the impact of three synthesized curcumin derivatives – curcumin, derivative 20 and derivative 27 – on type 2 diabetes mellitus.

To evaluate the hypoglycemic activity, it was performed a three-day *in vivo* study consisting in a daily subcutaneous administration of curcumin derivatives in Goto-Kakizaki rats. At day 3, the ability to decrease the insulin resistance was evaluated through Insulin Tolerance Test. The Alamar Blue assay was used in the murine macrophage cell line RAW 264.7 and fibroblast-like cell line COS-7 to assess the cytotoxic activity of curcumin and its derivatives. The same cell line RAW 264.7 enrolled a Griess assay to determine the anti-inflammatory activity. Finally, the antioxidant activity was determined by a modified Thiobarbituric Acid Reactive Substances assay.

The authors concluded that derivative 27 is quite promising for future research, as it revealed a strong antidiabetic activity and a selectivity to inhibit macrophage proliferation, which may be useful in the established inflammation in type 2 diabetes mellitus. Future research should focus on the cellular and molecular mechanisms underlying the observed effects and on the development of an ideal formulation compatible with biological matrices, since dissolution of curcumin and its derivatives is a major problem.

**Keywords:** curcumin, curcumin derivatives, type 2 diabetes mellitus, Goto-Kakizaki rats, cell viability, anti-inflammatory activity, antioxidant activity.

## RESUMO

Atualmente, a Diabetes Mellitus tipo 2 é um dos principais problemas de saúde pública. Embora a lista de fármacos antidiabéticos seja extensa, a verdade é que os objetivos terapêuticos não são totalmente cumpridos. Adicionalmente, alguns efeitos adversos podem provocar uma baixa adesão à terapêutica, sendo a força motriz para a investigação de novos fármacos antidiabéticos.

O nosso interesse pela curcumina deve-se ao uso tradicional do rizoma de *Curcuma longa* na Índia e na China para tratar a diabetes. Para além disso, vários estudos têm demonstrado que a curcumina e os seus derivados apresentam uma ampla variedade de efeitos biológicos, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória e imunomoduladora. Desta forma, o objetivo deste estudo piloto foi avaliar o impacto de três derivados sintetizados da curcumina – curcumina, derivado 20 e derivado 27 – na Diabetes Mellitus tipo 2.

Para avaliar a atividade hipoglicemiante, foi realizado um estudo *in vivo* de três dias consistindo na administração subcutânea diária de derivados de curcumina em ratos Goto-Kakizaki. No terceiro dia, a capacidade de diminuir a resistência à insulina foi avaliada através do Teste de Tolerância à Insulina. O ensaio Alamar Blue foi utilizado na linha celular de macrófagos murinos RAW 264.7 e na linha celular semelhante a fibroblastos COS-7 para avaliar a atividade citotóxica da curcumina e dos seus derivados. A mesma linha celular RAW 264.7 foi submetida ao ensaio de Griess para determinar a atividade anti-inflamatória. Finalmente, a atividade antioxidante foi determinada através de um ensaio modificado de Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico.

Os autores concluíram que o derivado 27 é bastante promissor para estudos futuros, uma vez que revelou uma forte atividade antidiabética e uma seletividade para inibir a proliferação de macrófagos, o que poderá ser útil na inflamação instaurada na Diabetes Mellitus tipo 2. Os estudos futuros deverão focar-se nos mecanismos celulares e moleculares subjacentes aos efeitos observados e no desenvolvimento de uma formulação ideal compatível com matrizes biológicas, uma vez que a dissolução da curcumina e dos seus derivados é um problema relevante.

**Palavras-chave:** curcumina, derivados da curcumina, Diabetes Mellitus tipo 2, ratos Goto-Kakizaki, viabilidade celular, atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante.

## **ABBREVIATIONS**

ABAP – 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride

AGE – advance glycosylation end products

AMPK – adenosine monophosphate-activated protein kinase

ATCC – American Type Culture Collection

AUC – area under the curve

BHT – butylated hydroxytoluene

BMI – body mass index

CO<sub>2</sub> – carbon dioxide

COX – cyclooxygenase

DM – diabetes mellitus

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – dimethyl sulfoxide

DPP-4 – dipeptidyl peptidase-4

ETC – electron transport chain

GK – Goto-Kakizaki

GLP-1 – glucagon-like peptide-1

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule-1

iCBR – Institute for Clinical and Biomedical Research

IL-1 – interleukin-1

IL-1 $\beta$  – interleukin-1 $\beta$

IL-6 – interleukin-6

iNOS – inducible nitric oxide synthase

ITT – insulin tolerance test

KCl – potassium chloride

LPS – lipopolysaccharide

MDA – malondialdehyde

NADPH – nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

NF- $\kappa$ B – nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells

NO – nitric oxide

NOS – nitric oxide synthase

PI3K – phosphatidylinositol 3-kinase

PKC – protein kinase C

SDS – sodium dodecyl sulphate

SEM – standard error of the mean

SGLT-2 – sodium-glucose co-transporter 2

SIRT1 – sirtuin 1

T1D – type 1 diabetes

T2D – type 2 diabetes

TBA – thiobarbituric acid

TBARS – thiobarbituric acid reactive substances

TNF- $\alpha$  – tumor necrosis factor- $\alpha$

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule-1

## I. INTRODUCTION

In 2015, more than one million Portuguese aged between 20 and 79 years old were suffering from diabetes mellitus (DM), resulting in an estimated prevalence of 13.3%. Moreover, it is noticeable that the prevalence is larger in men and, particularly, in elderly. There is also a strong link between body mass index (BMI) and DM, as 90% of diabetic population reveal overweight or obesity.<sup>1</sup> Comparing these numbers with previous reports, we realize that DM presents a thriving world prevalence, being one of the major public health problems. In fact, at this rate of growth, it is expected that it will affect one out of ten people by 2040.<sup>2</sup>

### I.1. DIABETES: UNDERSTANDING THE BASIS

Considering that 90-95% cases of DM are classified as type 2 diabetes (T2D), it is fundamental to understand its etiology. It is known that unhealthy lifestyle habits (i.e. diets rich in fats and sugar, lack of physical activity and visceral obesity), advanced age and genetic background can trigger this disease, but in what way? Likewise type 1 diabetes (T1D), T2D is a multifactorial and chronic disease characterized by hyperglycemia. The causes for this condition, however, may include not only decreased insulin secretion by pancreatic  $\beta$ -cells but also resistance to this hormone by insulin-dependent cells and tissues.<sup>3</sup>

The endocrine pancreas consists in Langerhans islets. Each islet comprises about 75% of  $\beta$ -cells, which secrete insulin, a hormone containing two polypeptide chains linked together. The main target tissues of insulin are the liver, adipose tissue, muscles and the hypothalamus that controls appetite. At these sites, insulin molecules bind to membrane receptors, leading to phosphorylation of specific proteins in the membrane. This leads to an increase, in the plasma membrane, of the number of transport proteins for glucose and amino acids. Thereafter, insulin and receptor molecules are endocytosed into the cells. Finally, insulin molecules are released and cut within cells, with integration of insulin receptors back into the cell membrane. In general, insulin increases the uptake and utilization of glucose and amino acids by target tissues. Therefore, without insulin, the ability of these tissues to capture and use glucose and amino acids is insignificant. Insulin secretion is controlled by blood levels of nutrients (e.g. high glucose levels following a meal), nerve

stimulation and hormone control. However, in some cases of T2D, Langerhans islet cells degenerate and glycemia is not regulated, as in T1D.<sup>4</sup> The reason for this degeneration is not well known, but there is evidence that  $\beta$ -cells malfunction may be triggered by inflammation in Langerhans islet, which leads to the production of Interleukin- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) by macrophages or  $\beta$ -cells themselves.<sup>5,6</sup>

On the other hand, in the vast majority of circumstances, patients with T2D present overweight and an inability to respond to insulin. The causes may include leptin (hormone that decreases target tissue response to insulin) secretion by adipose tissue, abnormal insulin receptors, deactivation by antibodies or anomalies in the signalling pathway of insulin.<sup>4</sup> However, patients with overweight or obesity reveal an enlargement of adipose tissue filled with macrophages secreting several proinflammatory cytokines, such as Tumor Necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1) and Interleukin-6 (IL-6).<sup>6,7</sup> In fact, all of these cytokines are partly responsible for insulin resistance and, consequently, impaired glucose transport into muscle and adipose tissues. Apart from that, the release of non-esterified fatty acids from adipose tissue to the bloodstream is also a reasonable cause for insulin resistance, as they increase muscle levels of diacylglycerol and long-chain acyl-coenzyme A. These muscle lipids activate kinases that are essential in insulin signalling, such as Protein Kinase C (PKC). Activated PKC leads, simultaneously, to an increase of serine phosphorylation and decrease of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate, resulting in a low activity of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Protein Kinase B or Akt. Consequently, transport proteins for glucose cannot migrate to the cell membrane, preventing glucose uptake.<sup>7</sup> Similarly, insulin resistance results in hyperglycemia after meals.<sup>4</sup>

At this point, it seems that inflammation plays a major role in the pathogenesis of T2D. Furthermore, high blood glucose levels lead to disruption of the innate immune system. As a result, higher levels of proinflammatory cytokines secreted by leukocytes (e.g. TNF- $\alpha$ ) explain the established inflammation that characterizes T2D and its complications.<sup>3</sup> Diabetic complications include, but are not limited to, diabetic retinopathy, diabetic nephropathy and diabetic neuropathy. In basically every complication there are reactive oxygen species involved. Oxidative stress may result from the advance glycation end products (AGE) formation, mitochondrial electron transport chain (ETC)/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase activity or nitric oxide synthase (NOS) deregulation.<sup>6</sup>

## I.2. THERAPEUTIC OPTIONS

Approximately 25-30% of patients with T2D are treated with insulin; more than 50% are undergoing oral antidiabetics; the remaining patients control their blood glucose levels with exercise and diet.<sup>4</sup> Some of the drugs used in T2D are briefly mentioned in the following table<sup>8</sup>:

Table 1 - Treatment of T2D

Therapeutic group	Mechanism of action	Comments
Biguanides - Metformin	↓ hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis	Common gastrointestinal effects (nausea and diarrhoea), potential deficit of B12 vitamin, risk of lactic acidosis
Sodium-glucose co-transporter 2 (SGLT-2) inhibitors - Dapagliflozin - Empagliflozin	↓ renal glucose reabsorption ↑ glycosuria	Risk of bone fractures, genitourinary infections and hypotension
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists - Exenatide - Liraglutide	↑ insulin secretion ↓ glucagon secretion Delay of gastric emptying ↑ satiety	Common gastrointestinal effects (nausea, vomit and diarrhoea), cutaneous reaction in injection site, risk of acute pancreatitis (lack of evidence)
Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors - Sitagliptin - Vildagliptin	↑ insulin secretion ↓ glucagon secretion	Risk of acute pancreatitis (lack of evidence)
Thiazolidinediones - Pioglitazone	↑ sensibility to insulin	Contraindicated for heart failure, risk of oedema, bone fractures and bladder cancer (lack of evidence)
Sulfonylureas - Glibenclamide - Glipizide - Gliclazide - Glimepiride	↑ insulin secretion	Risk of hypoglycemia, increased weight
Insulin	Activation of insulin receptors	Risk of hypoglycemia, cutaneous reaction in injection site

Although there are several antidiabetic drugs, including some with cardiovascular benefits (e.g. metformin, SGLT-2 inhibitors, GLP-1 receptor agonists and pioglitazone)<sup>9</sup>, target goals are not fully accomplished.<sup>10</sup> Besides, as we can observe in table 1, there are



some significant adverse effects that could contribute to a low compliance, which is the driving force for the investigation of new antidiabetic drugs.

### 1.3. NATURAL COMPOUNDS: IS CURCUMIN AN OPTION?

The use of herbal substances and preparations are well documented during the course of History. In fact, there are plants which were used, in the past, to relieve the symptoms of diabetes in Southern and Eastern Europe, such as *Galega officinalis*.<sup>10</sup> With this in mind, this study was performed to verify the potential activity of curcumin and its derivatives in T2D, since it is the most active component of the spice turmeric - herbal preparation derived from the rhizome of *Curcuma longa*.<sup>11</sup>

Even though *C. longa* rhizome is traditionally used in India and China to treat diabetes for numerous centuries<sup>11</sup>, its European Union herbal monograph does not include this indication. Actually, *C. longa* is used in Europe to relieve digestive disturbances (e.g. symptoms of fullness, flatulence and slow digestion).<sup>12</sup> Nevertheless, the European Medicines Agency consents that ethanolic extracts of turmeric can reduce blood glucose levels in type 2 diabetic KK-Ay mice.<sup>13</sup>

Until the present day, studies have indicated that curcumin is effective, but not toxic.<sup>14</sup> As a matter of fact, studies have shown that curcumin and its derivatives – curcuminoids – retain a wide range of biological protective effects, such as antioxidant<sup>14-17</sup>, anti-inflammatory<sup>14,16,18,19</sup>, immunomodulatory<sup>14</sup>, anti-tumour<sup>20</sup> and anti-apoptosis<sup>14</sup> activities. Furthermore, they play roles in numerous conditions, such as diabetes<sup>14,16,17,21</sup> and its complications<sup>14,17,19</sup>, brain aging<sup>14</sup>, obesity<sup>14</sup>, cardiovascular diseases<sup>14,16</sup>, rheumatoid arthritis<sup>14</sup>, inflammatory bowel disease<sup>14</sup>, cancer<sup>14,20,21</sup> and Alzheimer's disease<sup>14,16</sup>.

Curcumin is already much debated in terms of T2D and cancer. Several preclinical studies and even some clinical trials concluded that curcumin holds antidiabetic activity by decreasing hyperglycemia, hyperlipidaemia and insulin resistance. The main mechanisms of action are presented in Figure 1.<sup>21</sup>

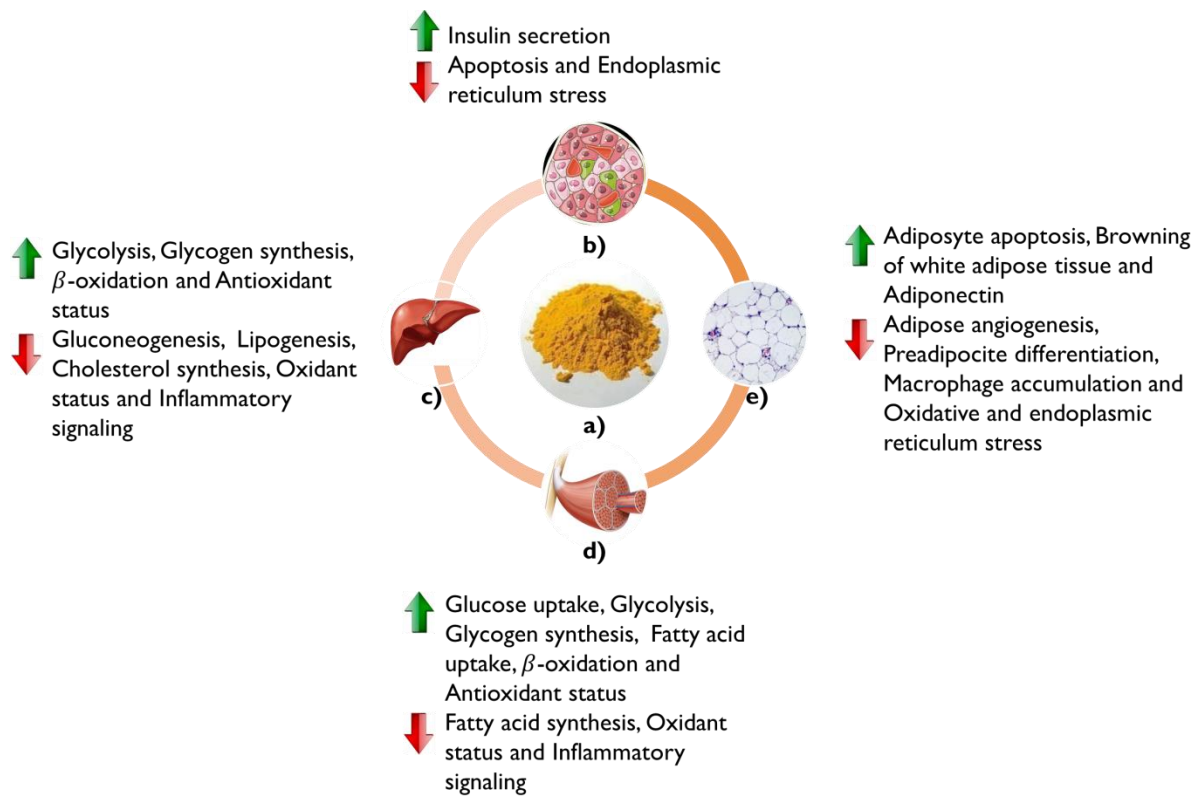


Figure 1 - Mechanisms of action of a) curcumin in the b) pancreatic  $\beta$ -cells, c) liver, d) skeletal muscle and e) white adipose tissue. As it can be observed, this compound has an impact on the glucose and lipid metabolism, oxidative stress and inflammation. (Adapted from WOJCIK *et al.*, 2018)

Additionally, other mechanisms have been studied concerning diabetic cardiomyopathy. As it was previously mentioned, inflammation and high levels of cytokines trigger the development of diabetes and its complications.<sup>6,14</sup> It is known that myocardial inflammation is caused by macrophages and leucocytes infiltration and increasing expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and inflammatory cytokines.<sup>14</sup> Curcumin is capable of suppressing nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B) signalling pathway<sup>14,22</sup> and defending against inflammation, cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis in the heart by decreasing inflammatory cytokines. This compound can also decrease serum glucose, glycated hemoglobin and AGE accumulation in diabetic rats. Regarding its antioxidant activity, curcumin can slow down the reduction of antioxidant enzymes and glutathione levels in the heart of diabetic rats. At last, it is recognised that cardiomyocyte apoptosis occurs in diabetes as a result of loss of mitochondrial function. In order to prevent this, curcumin maintains mitochondrial redox potential and protects cells against oxidative stress.<sup>14</sup>

To conclude, Kim and Clifton revised several papers in order to conclude about curcumin activities. They found that high doses of curcumin seem to decrease the risk of T2D, cardiovascular disease and neurodegenerative disease. The mechanisms of action include, but not only, improvement of glucose homeostasis, lipid metabolism, endothelial function and insulin signalling, as well as inhibition of platelet aggregation. These effects can result from the antioxidant and anti-inflammatory activities.<sup>16</sup>

#### 1.4. STUDIES PERFORMED

Several studies were performed to determine the different activities of curcumin and its derivatives. Here we intend to present some results that motivated this work. Firstly, we will focus on preclinical studies; then, we will aim our attention at clinical trials.

It is known that curcuminoids are not toxic to RAW 264.7 macrophages if concentration ranges from 1 to 10  $\mu\text{M}$ . Additionally, a study performed by Somchit *et al.* showed that curcumin inhibits inflammation by multiple mechanisms (e.g. inhibition of nitric oxide (NO) production, ubiquitination and degradation of inducible nitric oxide synthase (iNOS), etc.) at 12  $\mu\text{M}$ . Specifically, curcumin has proven to have anti-inflammatory activity by blockage of cyclooxygenase (COX)-2 in lipopolysaccharide (LPS)-activated RAW 264.7 macrophages.<sup>18</sup>

Yu *et al.* designed micelles filled with curcumin with the ability to change its size and surface charge at tumour sites in order to promote the delivery of an anticancer compound at low pH values. This strategy has revealed to be surprisingly promising, as inhibition of cancer growth reached a percentage of 65.6%.<sup>20</sup>

Fusi *et al.* performed a study to clarify whether natural compounds from the diet, including curcumin, have direct or specific antioxidant activity. It is known that antioxidants from diet, such as polyphenols and vitamins, can prevent oxidative stress by scavenging free radicals, inhibiting radical chain reactions, chelating metals, inhibiting oxidative enzymes and acting like antioxidant enzyme cofactors. In fact, one particular pathway was assessed in this study: the Sirtuin 1 (SIRT1)/Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase (AMPK) pathway. This study concluded that curcumin had a major antioxidant activity against hydroxyl radicals comparing to the reference antioxidant, acting as a superoxide radical scavenger. Moreover, curcumin seems to regulate endogenous antioxidant pathways

(increasing of SIRT1 expression and activation of AMPK), preserving mitochondrial function and inhibiting reactive oxygen species production, as well as eliminating them.<sup>15</sup>

Ponnusamy *et al.* performed a study to evaluate whether bisdemethoxycurcumin, one of the curcuminoids present in *C. longa*, can inhibit pancreatic  $\alpha$ -amylase. The study has revealed that this compound has potential to mitigate the digestion of starch, which leads to a decrease in the post-prandial hyperglycemia. Consequently, it could be a new hypoglycemic drug in T2D.<sup>23</sup>

Akbar *et al.* performed a study to clarify how mixed polymeric micelles filled with curcumin can control diabetes. The group has concluded that these micelles could significantly decrease blood glucose levels and improve lipid profile in rats. The results are similar to those obtained with metformin, both for micelles and pure curcumin dissolved in ethanol. The most plausible mechanism of action is the scavenging of active oxygen free radicals, which confirms the antioxidant activity of curcumin.<sup>17</sup>

Considering clinical trials, a study with 72 patients diagnosed with T2D, randomized into 3 groups, each receiving four capsules containing 150 mg of curcumin, 10 mg of atorvastatin or placebo daily during eight weeks, showed an improvement in the endothelial function and a substantial reduction in some inflammatory cytokines, which might be beneficial in vascular complications of diabetes.<sup>19</sup>

Zheng *et al.* revised clinical trials concerning curcumin supplementation in diabetic patients. In 2017, a study concluded that a dose of 1000 mg each day of curcuminoids supplementation, for twelve weeks, could prevent atherosclerosis in diabetic patients. In 2014, a clinical trial established that a dose of 1500 mg each day of curcuminoids, for six months, decreased insulin resistance and reduced the risk of cardiovascular complications in patients diagnosed with T2D. Moreover, the same study found that if the supplementation was prolonged to twelve months, the incidence of T2D was lower in pre-diabetic patients. Finally, in 2018, a clinical trial concluded that a dose of 1000 mg each day of curcumin supplementation, for twelve weeks, increases the adiponectin level and decreases the leptin concentration in patients with T2D.<sup>14</sup>

## I.5. EXISTING PATENTS

It was performed a smart search of patents in the Website Espacenet using the search phrase “Curcumin” AND “Diabetes”. From forty-five results obtained, we emphasize the following<sup>24</sup>:

Table 2 - Short list of five patents regarding “Curcumin” AND “Diabetes” search phrase in the Website Espacenet

1. Compositions for management of wounds, skin diseases, dehydration, chronic diseases, and respiratory diseases		
<b>Inventor(s):</b> Al-Waili Noori [US]	<b>Publication info:</b> US2019008907 (A1) 2019-01-10	<b>Abstract:</b> A composition that includes a mixture of honey, curcumin, propolis or CAPE or any two of them, which is used to treat a variety of medical conditions. Route of administration can be topical, oral, by inhalation or parenteral. The mixture is more effective than the single ingredients.
<b>Applicant(s):</b> Al-Waili Noori [US]		
2. Curcumin and resveratrol for chronic inflammation		
<b>Inventor(s):</b> Butt Christopher Michael [CH]; Riegger Christoph [CH]; Wynalda Kelly [CH]	<b>Publication info:</b> US2018333371 (A1) 2018-11-22	<b>Abstract:</b> The combination of curcumin and resveratrol can prevent the microglia from participating in the brain inflammation pathway. Thus it can prevent inflammation in the brain secondary to conditions such as obesity, diabetes, injury, and infection. The combination can also reduce chronic pain.
<b>Applicant(s):</b> DSM IP ASSETS BV [NL]		
5. Pharmaceutical composition used for treating metabolic syndrome disorders, infectious diseases, and complications thereof		
<b>Inventor(s):</b> Monkam Nitcheu Guy Faustin [Fr]	<b>Publication info:</b> WO2018127748 (A1) 2018-07-12	<b>Abstract:</b> A pharmaceutical composition with the combination of d-limonene, lupeol, cinnamaldehyde, epicatechin, methylhydroxychalcone polymer, $\beta$ -sitosterol and curcumin. It is suitable to prevent and treat obesity, diabetes, dyslipidaemias, infections and the consequences thereof, and in invasive cancers, in particular those associated with adipose tissues.
<b>Applicant(s):</b> Monkam Nitcheu Guy Faustin [Fr]		

Table 2 - Short list of five patents regarding “Curcumin” AND “Diabetes” search phrase in the Website Espacenet (cont.)

6. Curcumin composition with effect of preventing and treating DM and complications		
<p><b>Inventor(s):</b> Hu Ming; Nan Minlun; He Yufang; Jiang Wenye; Zou Hui; Qu Jiale; Zhao Quancheng</p> <p><b>Applicant(s):</b> Hu Ming</p>	<p><b>Publication info:</b> CNI07375430 (A) 2017-11-24</p>	<p><b>Abstract:</b> A composition using curcumin, dihydromyricetin and mulberry twig extract as main components. The composition has the effect of preventing and treating DM and its complications. The composition has the characteristics of low taking dosage and homology of medicines and foods and is a safe and effective health-care product. Proved by experiments, the composition has stronger activity in reducing the blood sugar than single ingredients.</p>
15. Pharmaceutical composition for use in the treatment of T2D		
<p><b>Inventor(s):</b> Larijani Bagher [IR]; Abdollahi Mohammad [IR]; Tabatabaei-Malazy Ozra [IR]</p> <p><b>Applicant(s):</b> Endocrinology &amp; Metabolism Res Center Endocrinology &amp; Metabolism Clinical Sciences Inst [IR]; Tehran Univ Of Medical Science [IR]</p>	<p><b>Publication info:</b> EP3187192 (A1) 2017-07-05</p>	<p><b>Abstract:</b> A composition comprising: a) a herbal extract from <i>Rosa</i> sp., <i>Urticadioica</i>, <i>Tanacetum vulgare</i> or mixtures thereof, b) curcumin, and c) quercetin. The composition is used in medical treatment, in particular in the treatment of T2D.</p>

## 2. OBJECTIVES

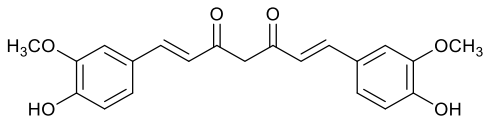
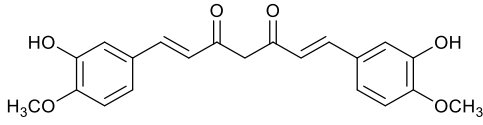
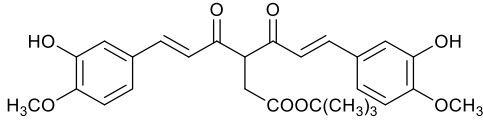
In this study we have analysed two curcumin derivatives and curcumin itself. It was evaluated their hypoglycemic, anti-inflammatory and antioxidant activities. The final aim of this research was to determine the most promising one to control T2D, to be included in further *in vivo* and *in vitro* studies, in order to clarify its mechanism of action.

### 3. MATERIALS AND METHODS

#### 3.1. CURCUMIN DERIVATIVES

The curcumin derivatives and curcumin itself were developed and synthesized by the Assistant Professors Maria Paulo Robalo and Fátima Piedade, from Centro de Química Estrutural, Complexo I, Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa. Their structure, molecular formula and molecular weight are presented in table 3. These compounds showed a low solubility in water and saline solution, but a higher solubility in dimethyl sulfoxide (DMSO). Consequently, curcumin and its derivatives were dissolved in this solvent.

Table 3 - Compound's name, structure, molecular formula and molecular weight

Compound	Structure	Molecular Formula	Molecular Weight
Derivative 19 (Curcumin)		$C_{21}H_{20}O_6$	368.39 g.mol <sup>-1</sup>
Derivative 20		$C_{21}H_{20}O_6$	368.39 g.mol <sup>-1</sup>
Derivative 27		$C_{27}H_{30}O_8$	482.53 g.mol <sup>-1</sup>

#### 3.2. REAGENTS

The insulin used in the *in vivo* study was Humulin NPH 100 UI/mL, from Lilly.

LPS from *Escherichia coli* (serotype 026:B6), Griess reagent (0.1% w/v N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride, 1% w/v sulfanilamide and 5% v/v phosphoric acid) and resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) were purchased to Sigma-Aldrich



Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Gibco™ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) was purchased to Alfacene (Lisbon, Portugal).

DMSO, 2,2-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (ABAP), potassium chloride (KCl), butylated hydroxytoluene (BHT) and thiobarbituric acid (TBA) were purchased to Sigma-Aldrich. Sodium dodecyl sulphate (SDS), acetic acid and n-butanol were purchased to VWR BDH Prolabo Chemicals, J.T.Baker and Scharlab, S.L., respectively.

### 3.3. EVALUATION OF HYPOGLYCEMIC ACTIVITY

#### 3.3.1. ANIMAL MODEL

Goto-Kakizaki (GK) rats, a non-obese animal model of T2D, from the vivarium of Coimbra Institute for Clinical and Biomedical Research (iCBR), Faculty of Medicine, University of Coimbra, kindly supplied by Professor Raquel Seiça and Doctor Paulo Matafome, with an average weight of 350 g were used to study the hypoglycemic activity. Animals were housed in pairs under standard laboratory conditions: temperature of  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ , relative humidity of 50-60%, a 12h light-12h dark cycle and fed *ad libitum* with tap water and rodent standard maintenance chow (A-04 Panlab, Barcelona, Spain). All procedures were performed according to the National and European Communities Council Directives on Animal Care. After acclimatization, animals were randomly divided into five groups and each group received a 100  $\mu\text{L}$  subcutaneous injection each day, for three days, of vehicle (DMSO), curcumin or its derivatives in equimolar doses, except for Control Group (Group 1). Group 2: four rats received vehicle. Group 3: two rats received curcumin (37.14 mg/kg). Group 4: three rats received derivative 20 (37.14 mg/kg). Group 5: two rats received derivative 27 (29.19 mg/kg). At day 3, after the last dose administration, the rodent maintenance chow was removed to estimate the 6h fasting blood glucose levels. Weight and glycemia of all animals were monitored in the beginning and in the end of the study, as well as food and water intake.

### 3.3.2. INSULIN TOLERANCE TEST

The hypoglycemic activity of the curcumin and its derivatives, specifically the ability to decrease the insulin resistance, was evaluated through the Insulin Tolerance Test (ITT). The ITT was performed at day 3 of treatment, after a 6h fasting period. The insulin was administered via intraperitoneal, in a dose of 0.25 UI/kg. Peripheral venous blood for measurement of glucose levels was sampled immediately before injection of insulin (0 minutes) and at 15, 30, 60 and 120 minutes thereafter with a glucometer (Accu-Chek Aviva, Roche, USA).<sup>25</sup>

### 3.4. EVALUATION OF CYTOTOXICITY

#### 3.4.1. CELL CULTURE AND MATERIALS

A murine macrophage cell line RAW 264.7, from American Type Culture Collection (ATCC number: TIB-71) and kindly supplied by Assistant Professor Teresa Cruz (Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra), was cultured in DMEM supplemented with 1.5 g sodium bicarbonate, 3.5 g glucose, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% non-inactivated fetal bovine serum.

A fibroblast-like cell line COS-7 from monkey kidney (ATCC number: CRL-1651) kindly supplied by Doctor Célia Cabral (iCBR, Faculty of Medicine, University of Coimbra) was cultured in DMEM supplemented with 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% non-inactivated fetal bovine serum.

Both cell lines were grown under standard conditions, specifically at 37 °C in a humidified 5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) atmosphere. In order to detect any morphological modification, cells were constantly monitored under microscope observation.

#### 3.4.2. ALAMAR BLUE ASSAY

Cell viability was assessed through Alamar Blue assay since it is simple, non-toxic to the cells, cheaper and comparable in terms of sensitivity to other methods.<sup>26</sup>

A Neubauer chamber and Trypan Blue were used to seed, in a Multiwell Plate size 96 wells (from Frilabo<sup>®</sup>), both RAW 264.7 and COS-7 cell lines at a density of  $0.3 \times 10^6$  cells/mL. Cells were grown and stabilized overnight under standard conditions. Then, RAW 264.7 macrophages and COS-7 fibroblasts were incubated for an additional 24h, at which time they were treated with curcumin and its derivatives (curcumin, derivative 20 and derivative 27) at a concentration of 5  $\mu$ M. DMSO was used as a vehicle control, at a concentration of 0.5%. This concentration was observed for all wells containing curcumin derivatives. There was used an additional control, namely stimuli-free control. After the 24h incubation with the stimuli, the initial media was fully removed and 150  $\mu$ L of a mixture containing new media and 10% of Resazurin (final concentration of 50  $\mu$ M) was added into each well and incubated at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 3h. The absorbance for each well was detected at 570 nm and 620 nm using the Synergy<sup>™</sup> HT (from BioTek<sup>®</sup>).

Data were obtained from three independent experiments in duplicate. Cell viability was calculated using the following formula:

$$\text{Cell Viability (\%)} = \frac{S1-S2}{C1-C2} \times 100$$

where S1 is the absorbance in the presence of each curcumin derivative detected at 570 nm, S2 is the absorbance in the presence of each curcumin derivative detected at 620 nm, C1 is the absorbance in the presence of DMSO (vehicle control) detected at 570 nm and C2 is the absorbance in the presence of DMSO (vehicle control) detected at 620 nm.

### 3.5. EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

#### 3.5.1. CELL CULTURE AND MATERIALS

A murine macrophage cell line RAW 264.7, from American Type Culture Collection (ATCC number: TIB-71) and kindly supplied by Assistant Professor Teresa Cruz (Centre for Neuroscience and Cell Biology, University of Coimbra), was cultured in DMEM supplemented with 1.5 g sodium bicarbonate, 3.5 g glucose, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin and 10% non-inactivated fetal bovine serum. Cells were grown under standard conditions, explicitly at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 3.5.2. GRIESS ASSAY

Anti-inflammatory activity was evaluated through Griess assay, which consists in the detection of NO production induced by LPS. This assay was performed on the supernatants, since they contain nitrites that undergo a colorimetric reaction.

A Neubauer chamber and Trypan Blue were used to seed, in a Multiwell Plate size 96 wells (from Frilabo<sup>®</sup>), the RAW 264.7 cell line at a density of  $0.3 \times 10^6$  cells/mL. Cells were grown and stabilized overnight under standard conditions. Then, RAW 264.7 macrophages were incubated for an additional 24h, at which time they were treated with curcumin and its derivatives (curcumin, derivative 20 and derivative 27) at a concentration of 5  $\mu$ M, in the presence of LPS (50 ng/mL). DMSO was used at a concentration of 0.5% in all wells containing curcumin derivatives. There were used two additional controls, namely: LPS at a concentration of 50 ng/mL and LPS at a concentration of 50 ng/mL simultaneously with DMSO at a concentration of 0.5%. After the 24h incubation with the stimuli, 150  $\mu$ L of the supernatants were transferred to a new Multiwell Plate size 96 wells, in which they were mixed with 150  $\mu$ L of Griess Reagent for 30 minutes, in the dark. Subsequently, the absorbance for each well was detected at 550 nm using the Synergy<sup>™</sup> HT (from BioTek<sup>®</sup>).<sup>27</sup>

Data were obtained from three independent experiments in duplicate. Instead of using a sodium nitrite standard curve to determine the nitrite concentration, data were expressed as the percentage of NO production, as it is observed in the following formula:

$$\text{NO Production (\%)} = \frac{S}{L} \times 100$$

where S is the absorbance obtained from curcumin derivative-treated macrophages in the presence of LPS and L is the absorbance obtained from LPS-treated macrophages. Anti-inflammatory index can be easily determined as follows:

$$\text{Anti-Inflammatory Index (\%)} = 100 - \text{NO Production (\%)}$$

### 3.6. EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

Antioxidant activity was determined by a modified Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) assay performed in two sets of experiments, in the presence (1) and absence (2) of ABAP, an inducer of lipid peroxidation.

Firstly, it was homogenized in potter, for 30 seconds, an egg yolk at a concentration of 10% w/v in KCl 1.15% w/v to be used as a lipid source. In both sets, 500  $\mu$ L of egg homogenate and 100  $\mu$ L of sample (curcumin and its derivatives at a concentration of 25  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) or positive control (BHT at a concentration of 250  $\mu$ M) were mixed in a test tube and made up to 1 mL with Milli-Q water. For set (1), this step was preceded by the addition of 50  $\mu$ L of ABAP 0.07 M. It was used 100  $\mu$ L of DMSO as a vehicle control. Then, it was successively added 1.5 mL of acetic acid 20% w/v (pH 3.5) and 1.5 mL of TBA solution at a concentration of 0.8% w/v in SDS 1.1% w/v. The test tubes were vortexed and heated at 95°C for 1 hour. After returning to room temperature, it was added 5 mL of n-butanol to each tube, vortexed and centrifuged at 4500 rpm for 15 min. Finally, it was measured the absorbance of the supernatant at 532 nm using the SmartSpec™ 3000 Spectrophotometer (from Bio-Rad®).<sup>28</sup>

Data were obtained from three independent experiments in triplicate. The antioxidant index was calculated using the following formula:

$$\text{Antioxidant Index (\%)} = \left(1 - \frac{S}{C}\right) \times 100$$

where S is the absorbance in the presence of each curcumin derivative and C is the absorbance in their absence (control).

### 3.7. STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) of three independent experiments. Statistical differences were evaluated by ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Values of  $p < 0.05$  were considered to indicate significant differences. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism PC Software and IBM SPSS Statistics Software.

## 4. RESULTS

### 4.1. EVALUATION OF HYPOGLYCEMIC ACTIVITY

To evaluate the potential hypoglycemic activity of curcumin and its derivatives in GK rats, it was performed a three-day *in vivo* study consisting on a daily subcutaneous administration of curcumin, its derivatives or vehicle (DMSO). At day 3, the ability to decrease the insulin resistance was evaluated through ITT. As shown in Figure 2, a three-day administration of both curcumin and its derivatives did not show an impact on GK rats' weight.

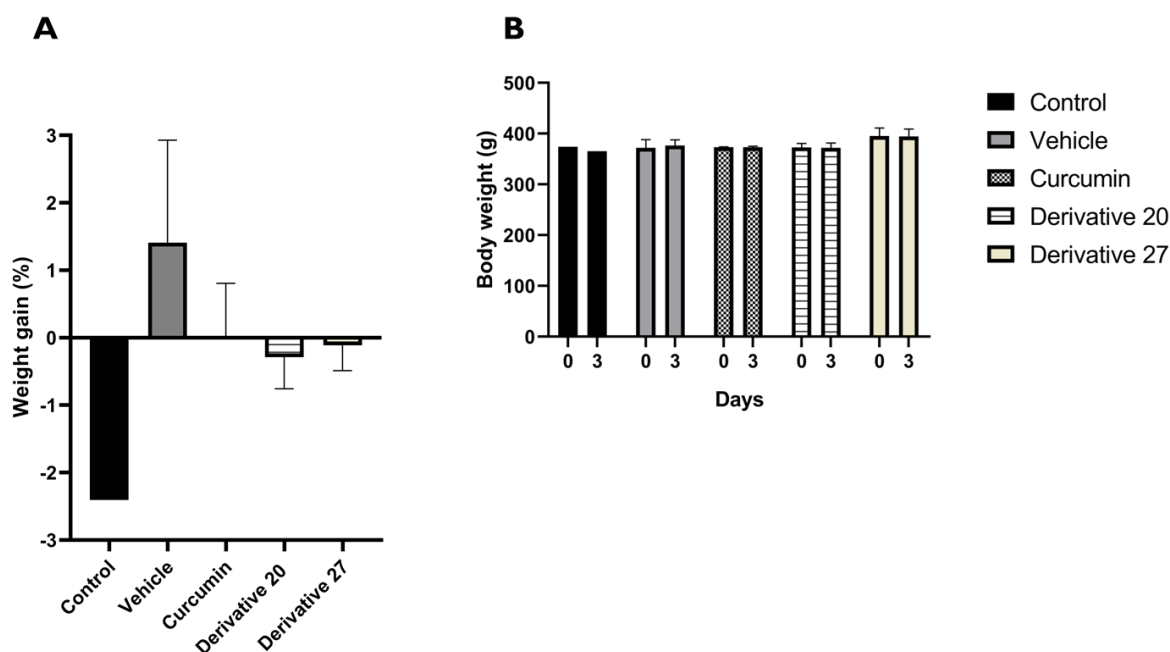


Figure 2 - Impact of curcumin and derivatives 20 and 27 on weight gain in GK rats, a non-obese animal model of T2D. (A) Weight gain expressed as a percentage of baseline weight. (B) Initial (day 0) and final (day 3) body weight expressed as g. Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of 2-4 animals per group.

On the other hand, the ITT performed at the third day of treatment showed a significant improvement in insulin responsiveness in the groups treated with curcumin and, particularly, derivative 27 (Figure 3). Vehicle control, however, also demonstrated a slight improvement in insulin responsiveness, demonstrating that the activity might not be only due to the action of curcumin derivatives.

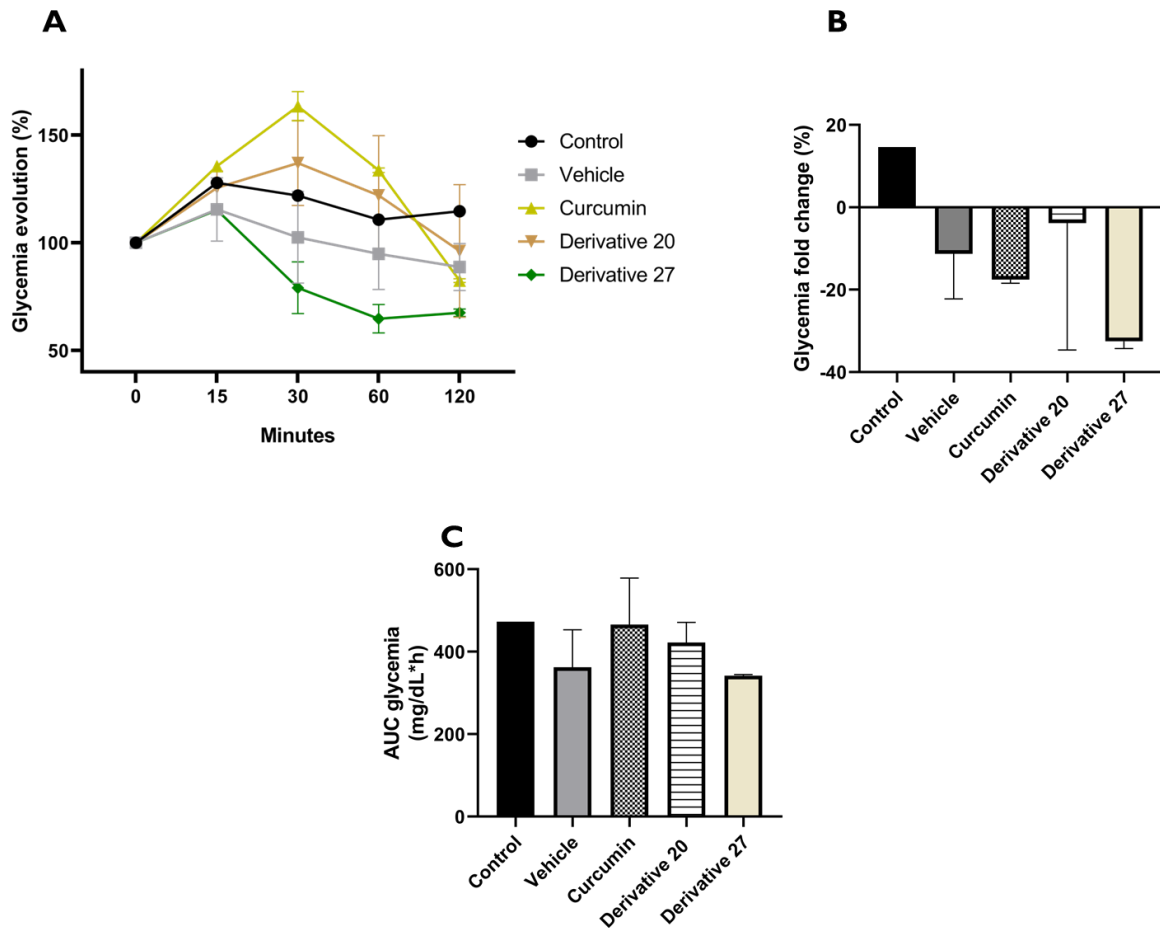


Figure 3 - ITT results after a three-day administration of curcumin and derivatives 20 and 27 in GK rats, a non-obese animal model of T2D. (A) ITT curve expressed as a percentage of baseline glycemia. (B) Fold change of glycemia. (C) Area under the curve (AUC) of the ITT for each group measured in mg/dL×h. Results are expressed as mean ± SEM of 2-4 animals per group.

## 4.2. EVALUATION OF CYTOTOXICITY

### 4.2.1. EFFECT OF CURCUMIN AND ITS DERIVATIVES ON RAW 264.7 CELL LINE VIABILITY

To evaluate the potential cytotoxic activity of curcumin and its derivatives in different mammalian cell types, the Alamar Blue assay was used in macrophages and fibroblasts. Twenty-four hours of LPS exposure had no significant effect on macrophages viability. As shown in Figure 4, both curcumin and derivative 20 did not show a significant cytotoxicity in macrophages, compared with vehicle control. However, derivative 27 demonstrated a significant cytotoxicity.

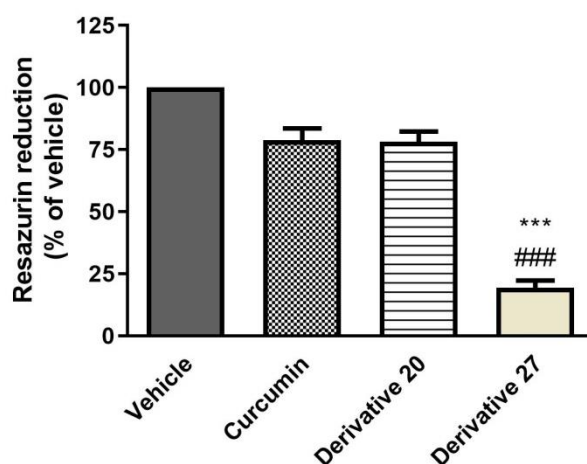


Figure 4 - Effect of curcumin and derivatives 20 and 27 on murine macrophage cell line RAW 264.7 viability (Alamar Blue Assay). Results are expressed as a percentage of resazurin reduction by control cells maintained in culture medium in the presence of vehicle. Each value represents the mean  $\pm$  SEM from three experiments, performed in duplicate (\*\* $p < 0.001$ , compared to vehicle; ### $p < 0.001$ , compared to curcumin and derivative 20).

#### 4.2.2. EFFECT OF CURCUMIN AND ITS DERIVATIVES ON COS-7 CELL LINE VIABILITY

As shown in Figure 5, both curcumin and its derivatives did not show significant cytotoxicity in fibroblasts, compared with vehicle control.

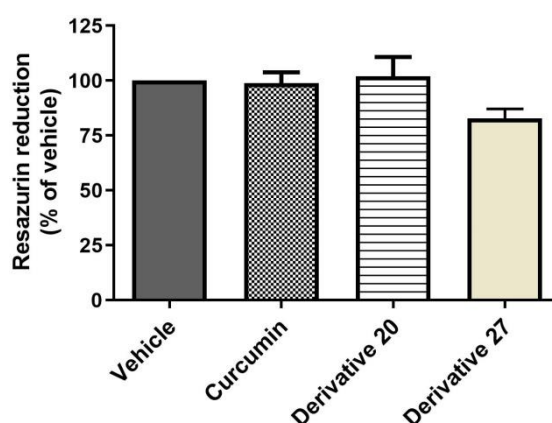


Figure 5 - Effect of curcumin and derivatives 20 and 27 on fibroblast-like cell line COS-7 viability (Alamar Blue Assay). Results are expressed as a percentage of resazurin reduction by control cells maintained in culture medium in the presence of vehicle. Each value represents the mean  $\pm$  SEM from three experiments, performed in triplicate.



### 4.3. EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY

The effect of curcumin and its derivatives on NO production induced by LPS was evaluated, through Griess assay, in the mouse macrophage cell line RAW 264.7. After macrophages stimulation with LPS in the presence of the curcumin derivatives, NO production was significantly reduced (Figure 6). Vehicle control, however, also demonstrated a slight reduction of NO production, demonstrating that the anti-inflammatory activity is not only due to the action of curcumin derivatives.

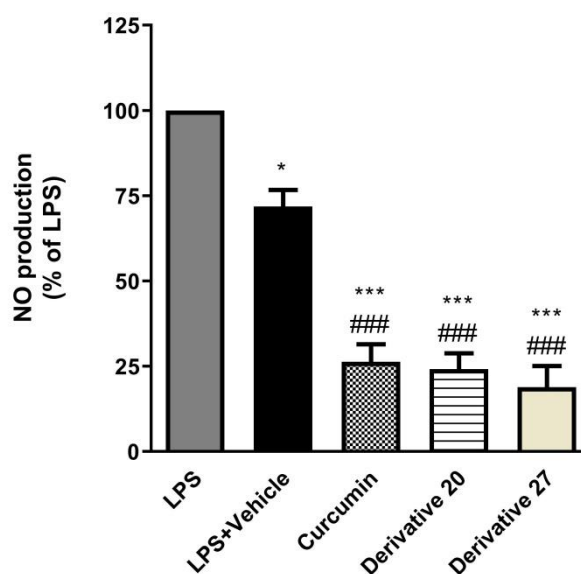


Figure 6 - Effect of curcumin and derivatives 20 and 27 on NO production in murine macrophage cell line RAW 264.7 (Griess Assay). Results are expressed as a percentage of nitrite production by cells cultured in the presence of LPS. Each value represents the mean  $\pm$  SEM from three experiments, performed in duplicate (\* $p$ <0.05, compared to LPS; \*\*\* $p$ <0.001, compared to LPS; ### $p$ <0.001, compared to LPS+Vehicle).

### 4.4. EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY

The antioxidant activity was evaluated through a modified TBARS assay. Different concentrations of the curcumin derivatives were tested in the presence and in the absence of ABAP, as well as a single concentration of BHT (standard antioxidant). The results shown in Table 4 demonstrate that curcumin possesses a considerable antioxidant activity at higher concentration (50  $\mu$ M), alternately to the minimal activity measured at lower concentration (25  $\mu$ M). The antioxidant activity of derivatives 20 and 27, however, cannot be detected at

lower concentration (25  $\mu\text{M}$ ) since we obtained negative indexes. Their antioxidant activity at higher concentration (50  $\mu\text{M}$ ) is considered negligible.

Table 4 - Antioxidant index (%) of BHT, curcumin and its derivatives, in different concentrations using TBARS assay in the absence or presence of ABAP

Standard/ Curcumin derivative		Concentration ( $\mu\text{M}$ )		
		25	50	250
Absence of ABAP	BHT	–	–	74.90 $\pm$ 4.35
	Curcumin	16.17 $\pm$ 2.12	56.45 $\pm$ 10.28	–
	Derivative 20	N.D.	15.61 $\pm$ 1.66	–
	Derivative 27	16.20 $\pm$ 1.32	11.66 $\pm$ 5.03	–
Presence of ABAP	BHT	–	–	63.09 $\pm$ 2.03
	Curcumin	9.25 $\pm$ 1.43	23.33 $\pm$ 6.28	–
	Derivative 20	N.D.	17.85 $\pm$ 5.18	–
	Derivative 27	N.D.	7.38 $\pm$ 0.77	–

N.D. (not detected)

## 5. DISCUSSION

Over the last few decades, several scientific studies have shown that curcumin is one of the most promising dietary compounds that decrease the risk of various diseases due to its antioxidant and anti-inflammatory activities. In fact, curcumin has been used in clinical trials to study its therapeutic application on metabolic syndrome.<sup>29</sup> In this context, it has emerged the opportunity to explore different biological activities of curcumin and its derivatives, all synthesized in the laboratory, with the aim to be used in T2D.

We started by performing a pilot study with GK rats, a non-obese animal model of T2D, to verify if the compounds had any potential application in T2D. The methodology was previously described in section 3.3., as well as the monitored parameters. Although there were no significant changes in rats' body weight (the largest weight loss was 2.4% and it has occurred in the control group, which was not as expected), we obtained quite promising results in the ITT. The ITT consists in an insulin administration and subsequent monitoring of glycemia to check insulin resistance, which typically characterizes T2D. We are, therefore, dealing with compounds with hypoglycemic activity when glycemia decreases after insulin administration, since it means that insulin had the ability to cause glucose uptake by insulin-dependent cells and tissues. As shown in Figure 3, the glycemia fold change allows us to infer that both curcumin ( $-17.6 \pm 0.9$ ) and particularly derivative 27 ( $-32.5 \pm 18.6$ ) significantly reduce blood glucose during ITT, demonstrating an improvement in insulin responsiveness. Derivative 20, on the other hand, showed a more modest decrease. The vehicle also exhibited some hypoglycemic activity, which means that the activity observed concerning curcumin and its derivatives may not be entirely due to these. Nonetheless, we decided to pursue further studies since we obtained promising findings with this preliminary study and there are already several studies in the literature referring to the anti-inflammatory and antioxidant activities of curcumin.

Macrophages are among the major innate immune cells involved in inflammation and response against pathogens and LPS is a strong stimulant of their activation.<sup>30</sup> Apart from macrophages activation, LPS can also stimulate the production of iNOS, TNF- $\alpha$  and some interleukins. This will generate an accumulation of inflammatory mediators and especially NO.<sup>31</sup> Under these circumstances, NO is considered a biomarker of inflammation. We are, therefore, facing compounds with anti-inflammatory activity when NO production is inhibited.

The anti-inflammatory activity of curcumin and its derivatives was evaluated in a representative *in vitro* model of peripheral inflammation, stimulating the macrophage cell line RAW 264.7 with LPS. Then, results were expressed as a percentage of NO production by LPS-treated control. We opted for the Griess assay since NO is a highly unstable radical which rapidly turns into nitrites that react with Griess reagent in aqueous solution. Both curcumin ( $26.28 \pm 9.03$ ) and derivatives 20 ( $24.16 \pm 8.09$ ) and 27 ( $18.85 \pm 10.83$ ) were found to significantly reduce NO production relatively to the LPS-treated control (100% NO production), which is according to the literature.<sup>29</sup> In fact, the phenolic groups in the structure of curcumin and its derivatives explain the ability to eliminate oxygen-derived free radicals, such as NO.<sup>13</sup> The vehicle, however, has also shown to slightly reduce NO production ( $71.87 \pm 8.38$ ). Although we have used DMSO in a concentration of 0.5% in our assays, this result was expected as there have been studies in which DMSO has shown anti-inflammatory activity at concentrations below 5%.<sup>32</sup> We decided to proceed the study using DMSO as a solvent even though it has some anti-inflammatory activity due to the low solubility of the compounds in other solvents and the subsequent lack of alternatives.

In the meantime, we evaluated the cytotoxicity of curcumin and its derivatives in the same macrophage cell line (RAW 264.7) to verify whether the inhibition of NO production was due to decreased cell proliferation. Cell viability was assessed by the Alamar Blue assay. This assay consists in providing resazurin, a blue dye, to cells so that they could uptake it and reduce it into resorufin, which has a fluorescent pink coloration that is spectrophotometrically quantified. Considering that this reaction is irreversible and it only occurs at the level of intracellular enzymes, the measurement of the fluorescent signal is proportional to cell density.<sup>33</sup> Because DMSO cytotoxicity depends more on exposure time than the concentration used, we decided to use DMSO-treated cells (vehicle control) as a reference in calculations to exclude any interference from the vehicle.<sup>32</sup>

Although curcumin ( $78.65 \pm 8.42$ ) and derivative 20 ( $78.15 \pm 7.05$ ) did not show significant cytotoxicity, derivative 27 ( $19.37 \pm 4.99$ ) significantly reduced resazurin reduction in macrophages. This may be due to the fact that macrophages are intrinsically related to cellular immunity. Having this in mind and taking into account that we did not notice morphological changes under microscope observation during the experiments, we decided to evaluate cytotoxicity in another cell line, namely fibroblasts (COS-7). We used the above-mentioned methodology, but this time it was found that both curcumin ( $98.75 \pm 8.77$ ) and derivatives 20 ( $101.95 \pm 15.25$ ) and 27 ( $82.79 \pm 7.50$ ) showed no cytotoxicity. All things considered, we concluded that derivative 27 has selectivity to inhibit macrophages

proliferation due to their function in cellular immunity, reinforcing the anti-inflammatory activity of derivative 27. It would be relevant to explore the cellular and molecular mechanisms underlying the curcumin derivatives' anti-inflammatory effects, especially that of derivative 27, and to verify the cytotoxicity of these compounds in human cell lines, namely hepatocytes and intestinal cells to conclude about the toxicological safety of potential oral formulations to be used in clinical context.

Finally, the antioxidant activity of curcumin and its derivatives was evaluated through the TBARS assay, in the presence and absence of a lipid peroxidation inducer (ABAP). Lipid peroxidation is the oxidative chain degradation that occurs in the membrane lipids after a free radical attack. In this case, the oxidative attack was triggered by ABAP. Within the products resulting from the chain reaction there is malondialdehyde (MDA), a biomarker of oxidative stress. MDA reacts with TBA to produce a dimeric compound, which has a pink coloration that is spectrophotometrically quantified relatively to the control. We are, therefore, facing compounds with antioxidant activity when MDA production is interrupted.<sup>34</sup>

To perform the modified TBARS assay, we used an egg homogenate as the lipid source. BHT was used as a standard antioxidant entirely to validate the method. In the absence of ABAP, only curcumin in the concentration of 50  $\mu$ M revealed potential antioxidant activity, since its derivatives showed lower activities (the lower concentration of derivative 20 did not even allow the detection of antioxidant activity). These results agree with current studies showing that curcumin has significant antioxidant activity.<sup>29</sup> In the presence of ABAP, on the other hand, both curcumin and especially its derivatives showed low antioxidant activity. The lower concentration of derivatives 20 and 27, inclusively, did not allow the detection of antioxidant activity, since negative indexes were obtained. These results suggest that curcumin derivatives are ineffective in reversing an established oxidative stress. It would be important, though, to repeat the evaluation of antioxidant activity using other concentrations.

In conclusion, curcumin had a performance quite comparable to the effects reported in the literature, which was expected. Concerning derivatives 20 and 27, it is important to understand the structural modifications curcumin has undergone. In both synthesized derivatives, the methoxy group shifted from *meta* position to *para* position, while the hydroxyl group shifted from *para* position to *meta* position relatively to the  $\beta$ -diketone chain. This modification appears to increase the anti-inflammatory activity but seems to

retain no antioxidant activity. This explains why derivative 20 did not reveal a significant advantage over curcumin. On the other hand, derivative 27 succeeded in the *in vivo* study and in the Griess assay. In fact, when it comes to derivative 27, we face an additional structural modification, namely the insertion of a tert-butyloxycarbonyl group in the central position that provides a more hydrophobic nature than curcumin and derivative 20. The lower solubility in aqueous solution delays its excretion from the organism, increasing its half-life and most probably its potency.

Thus, it remains the necessity to explore the mechanism of action of these compounds and to develop formulations compatible with biological matrices, in order to optimize pharmacodynamics and pharmacokinetics. Another difficulty we encountered was the dissolution of curcumin and its derivatives to ensure proper bioavailability, as these compounds are highly hydrophobic and therefore poorly soluble in body fluids and poorly absorbed orally. Sanidad *et al.* made a review article precisely reflecting on this problematic. Some raised solutions point to formulations containing radical scavenging antioxidants to inhibit chemical degradation of curcumin in aqueous solutions, as well as encapsulation of curcumin in mixed micelles (utilization of medium-chain and long-chain triglycerides) to decrease its degradation and increase its absorption.<sup>29</sup>

## 6. CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

Taking into account the obtained results, we consider that we have achieved the main aim of this paper. We concluded that derivative 27 is quite promising for future research, as it revealed a strong antidiabetic activity, namely insulin-sensitizing, and a selectivity to inhibit macrophage proliferation, which may be useful in the established inflammation in T2D. Curcumin may be included in further studies as a reference, since it also showed satisfactory results. On the other hand, derivative 20 showed no advantage over curcumin.

To complement this study, we recommend: a) repeating the evaluation of antioxidant activity using other concentrations; b) exploring the cellular and molecular mechanisms underlying the observed effects; c) verifying the cytotoxicity of the curcumin derivatives in human hepatocytes and intestinal cells; d) developing an ideal formulation compatible with biological matrices.

## 7. REFERENCES

1. PORTUGAL. Observatório Nacional da Diabetes – **Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2015 – Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes**. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Diabetologia, 2016.
2. FERREIRA, L., CARVALHO, R. – **Tratamento da Diabetes Mellitus Tipo 2 e Prevenção Cardiovascular em Indivíduos com Pé Diabético**. Revista Portuguesa de Diabetes. 2018; 13 (2): 70-77.
3. NAIDOO, V., NAIDOO, M., GHAI, M. – **Cell and tissue specific epigenetic changes associated with chronic inflammation in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus**. Scandinavian Journal of Immunology. 2018; 88(6), 1-13.
4. SEELEY, R., STEPHENS, T., TATE, P. – **Anatomia & Fisiologia**. 6ª Ed. Loures: Lusociência, 2005. ISBN 972-8930-07-0.
5. LUMENG, C. N., SALTIEL, A. R. – **Inflammatory links between obesity and metabolic disease**. The Journal of Clinical Investigation. 2011; 121(6), 2111-2117.
6. NAVALE, A. M., PARANJAPE, A. N. – **Role of inflammation in development of diabetic complications and commonly used inflammatory markers with respect to diabetic complications**. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2013; 5(Suppl. 2), 1-5.
7. VARMA, V., YAO-BORENGASSER, A., RASOULI, N., NOLEN, G. T., PHANAVANH, B., STARKS, T., GURLEY, C., SIMPSON, P., MCGEHEE, R. E., KERN P. A., PETERSON, C. A. – **Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action**. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism. 2009; 296(6), E1300-E1310.
8. DUARTE, R., MELO, M., NUNES, J. S., MELO, P. C., RAPOSO, J. F., CARVALHO D. – **Recomendações Nacionais da SPD para o Tratamento da Hiperglicemia na Diabetes Tipo 2 – Atualização 2018/19 com Base na Posição Conjunta ADA/EASD**. Revista Portuguesa de Diabetes. 2018; 13(4), 154-180.

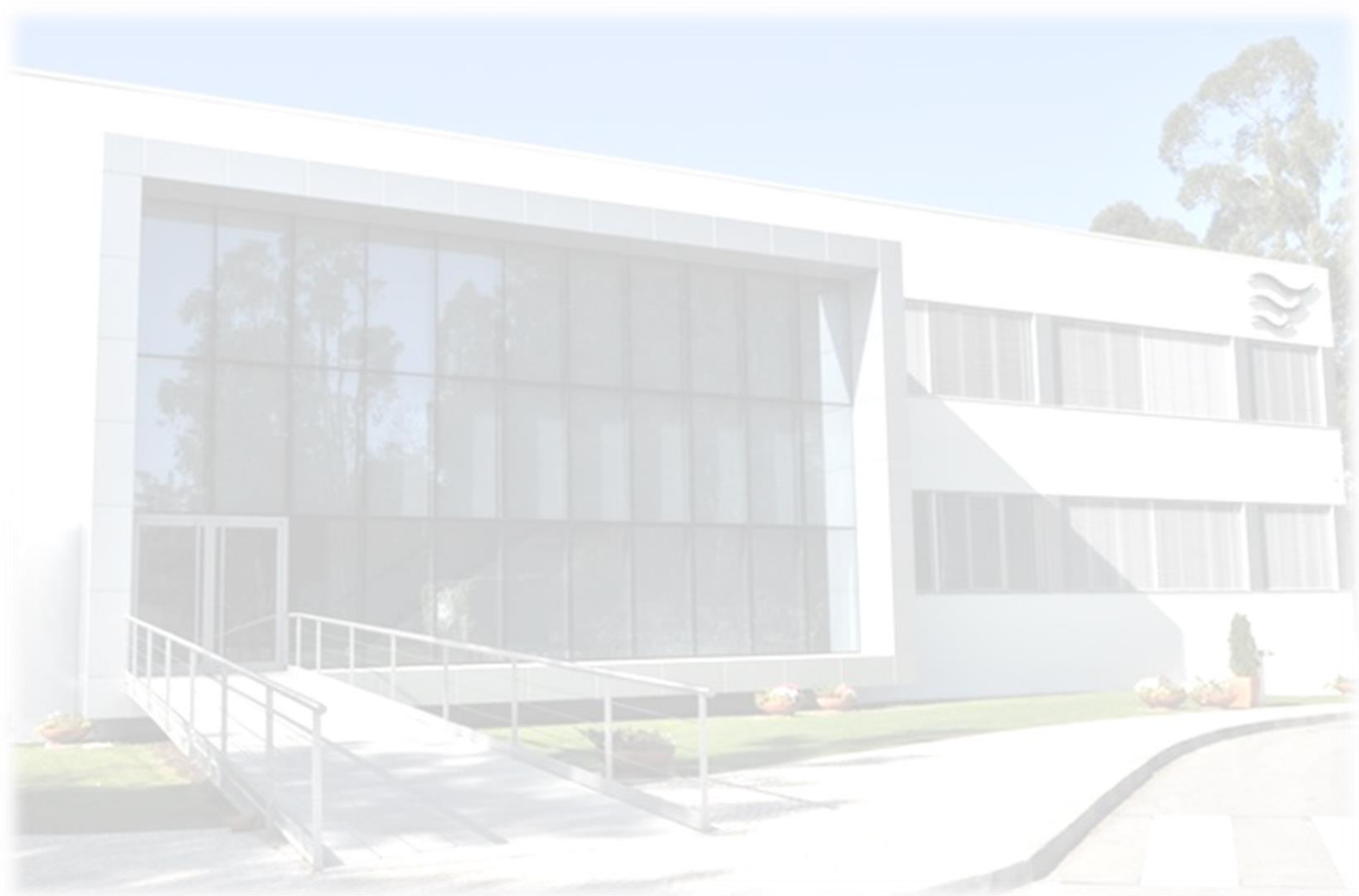


9. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – **8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes – 2018**. Diabetes Care. 2018; 41 (Suppl. 1), S73-S85.
10. BLASLOV, K., NARANDA, F. S., KRULJAC I., RENAR I. P. – **Treatment approach to type 2 diabetes: Past, present and future**. World Journal of Diabetes. 2018; 9(12), 209-219.
11. ZHANG, D., FU, M., GAO, S., LIU, J. – **Curcumin and Diabetes: A Systematic Review**. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013; 2013, 1-16.
12. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS – **European Union herbal monograph on Curcuma longa L., rhizoma**. European Medicines Agency, 2018.
13. COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS – **Assessment report on Curcuma longa L., rhizoma**. European Medicines Agency, 2018.
14. ZHENG, J., CHENG, J., ZHENG, S., FENG, Q., XIAO, X. – **Curcumin, A Polyphenolic Curcuminoid With Its Protective Effects and Molecular Mechanisms in Diabetes and Diabetic Cardiomyopathy**. Frontiers in Pharmacology. 2018; 9(472), 1-10.
15. FUSI, J., BIANCHI, S., DANIELE, S., PELLEGRINI, S., MARTINI, C., GALETTA, F., GIOVANNINI, L., FRANZONI, F. – **An in vitro comparative study of the antioxidant activity and SIRT1 modulation of natural compounds**. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2018; 101, 805-819.
16. KIM, Y., CLIFTON, P. – **Curcumin, Cardiometabolic Health and Dementia**. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2018; 15(2093), 1-34.
17. AKBAR, M. U., ZIA, K. M., AKASH, M. S. H., NAZIR, A., ZUBER, M., IBRAHIM, M. – **In-vivo anti-diabetic and wound healing potential of chitosan/alginate/maltodextrin/pluronic-based mixed polymeric micelles: Curcumin therapeutic potential**. International Journal of Biological Macromolecules. 2018; 120(B), 2418-2430.

18. SOMCHIT, N., KIMSENG, R., DHAR, R., HIRANSAI, P., CHANGTAM, C., SUKSAMRARN, A., CHUNGLOK, W., CHUNGLOK, W. – **Curcumin pyrazole blocks lipopolysaccharide-induced inflammation via suppression of JNK activation in RAW 264.7 macrophages.** Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology. 2017; 36(3), 184-190.
19. USHARANI, P., MATEEN, A. A., NAIDU, M. U. R., RAJU, Y. S. N., CHANDRA, N. – **Effect of NCB-02, Atorvastatin and Placebo on Endothelial Function, Oxidative Stress and Inflammatory Markers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus.** Drugs in R&D. 2008; 9(4), 243-250.
20. YU, Y., ZHANG, X., QIU, L. – **The anti-tumor efficacy of curcumin when delivered by size/charge-changing multistage polymeric micelles based on amphiphilic poly( $\beta$ -amino ester) derivatives.** Biomaterials. 2014; 35, 3467-3479.
21. WOJCIK, M., KRAWCZYK, M., WOJCIK, P., CYPRYK, K., WOZNIAK, L. A. – **Molecular Mechanisms Underlying Curcumin-Mediated Therapeutic Effects in Type 2 Diabetes and Cancer.** Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2018; 2018(7), 1-14.
22. MARADANA, M. R., THOMAS, R., O'SULLIVAN, B. J. – **Targeted delivery of curcumin for treating type 2 diabetes.** Molecular Nutrition & Food Research. 2013; 00, 1-7.
23. PONNUSAMY, S., ZINJARDE, S., BHARGAVA, S., RAJAMOCHANAN, P. R., KUMAR, A. R. – **Discovering Bisdemethoxycurcumin from Curcuma longa rhizome as a potent small molecule inhibitor of human pancreatic  $\alpha$ -amylase, a target for type-2 diabetes.** Food Chemistry. 2012; 135, 2638-2642.
24. EUROPEAN PATENT OFFICE – **Espacenet.** Available in <https://worldwide.espacenet.com> (consulted in 05/03/2019)
25. SOTO-RIVERA, C. L., MAJZOUB, J. A. – **Adrenocorticotrophin.** In: MELMED, S., The Pituitary. United States: Academic Press, 2017. ISBN: 978-0-12-804169-7, p. 47-83.
26. NAKAYAMA, G. R., CATON, M. C., NOVA, M. P., PARANDOOSH, Z. – **Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro.** Journal of Immunological Methods. 1997; 204(2), 205-208.

27. TSIKAS, D. – **Naalysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: Appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research.** Journal of Chromatography B. 2007; 851, 51-70.
28. CABRAL, C., POÇAS, J., GONÇALVES, M. J., CAVALEIRO, C., CRUZ, M. T., SALGUEIRO, L. – ***Ridolfia segetum* (L.) Moris (Apiaceae) from Portugal: A source of safe antioxidant and anti-inflammatory essential oil.** Industrial Crops and Products. 2015; 65, 56-61.
29. SANIDAD, K. Z., SUKAMTOH, E., XIAO, H., MCCLEMENTS, D. J., ZHANG, G. – **Curcumin: Recent Advances in the Development of Strategies to Improve Oral Bioavailability.** Annual Review of Food Science and Technology. 2019; 10, 19.1-19.21.
30. OHNISHI, K., KOMOHARA, Y., FUJIWARA, Y., TAKEMURA, K., LEI, X. F., NAKAGAWA, T., SAKASHITA, N., TAKEYA, M. – **Suppression of TLR4-mediated inflammatory response by macrophage class A scavenger receptor (CD204).** Biochemical and Biophysical Research Communications. 2011; 411, 516-522.
31. ZHU, J., LUO, C., WANG, P., HE, Q., ZHOU, J., PENG, H. – **Saikosaponin A mediates the inflammatory response by inhibiting the MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.** Experimental and Therapeutic Medicine. 2013; 5, 1345-1350.
32. COSTA, L. A., OTTONI, M. H. F., SANTOS, M. G., MEIRELES, A. B., ALMEIDA, V. G., PEREIRA, W. F., AVELAR-FREITAS, B. A., BRITO-MELO, G. E. A. – **Dimethyl Sulfoxide (DMSO) Decreases Cell Proliferation and TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , and IL-2 Cytokines Production in Cultures of Peripheral Blood Lymphocytes.** Molecules. 2017; 22(11), 1-10.
33. UZARSKI, J. S., DIVITO, M. D., WERTHEIM, J. A., MILLER, W. M. – **Essential design considerations for the resazurin reduction assay to noninvasively quantify cell expansion within perfused extracellular matrix scaffolds.** Biomaterials. 2017; 129, 163-175.
34. GHANI, M. A., BARRIL, C., BEDGOOD JR., D. R., PRENZLER, P. D. – **Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay.** Food Chemistry. 2017; 230, 195-207.

# RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA



## **ABREVIATURAS**

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

PQR – *Product Quality Review*

QP&C – Qualidade do Produto & *Compliance*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## I. INTRODUÇÃO

O estatuto da Ordem dos Farmacêuticos, determinado pelo Decreto-Lei n.º 131/2015, no artigo 75.º (Conteúdo), refere o seguinte: «Integram o conteúdo de ato farmacêutico as seguintes atividades: [...] b) Registo, fabrico e controlo dos medicamentos de uso humano [...]».<sup>1</sup> De facto, no decorrer do meu percurso académico, foi notória a importância do papel desempenhado pelo Farmacêutico na Indústria Farmacêutica, tanto na investigação e desenvolvimento de formulações como no fabrico e acondicionamento de produtos farmacêuticos, passando obviamente por todas as questões regulamentares e de garantia de qualidade. Nesta perspetiva, bem como visando consolidar os conhecimentos adquiridos nos últimos cinco anos, surgiu em mim um peculiar interesse em conhecer esta saída profissional.

Após uma entrevista presencial, surgiu uma proposta de realização de um estágio na Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A. – doravante designada Bluepharma –, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular, que encerra o ciclo de estudos do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. O estágio decorreu no departamento de Qualidade do Produto & Compliance (QP&C), sob a distinta orientação da Dra. Maria Teresa Murta – Diretora Técnica/*Qualified Person* e diretora do departamento de QP&C – e da Dra. Rita Gaspar, tendo tido a duração de três meses. Tomando em consideração as Normas Orientadoras vigentes, pretendo, no presente relatório de estágio, analisar de forma fundamentada e segundo um formato SWOT todas as atividades desenvolvidas e experiências vividas na Bluepharma.

## 2. BLUEPHARMA

A Bluepharma é uma empresa nacional enquadrada na Indústria Farmacêutica desde 2001, quando adquiriu a unidade de produção à Bayer. Tendo quase meio século de existência, as instalações produtivas sofreram, ao longo da sua história, períodos de expansão e reestruturação. De facto, para além da sua sede em S. Martinho do Bispo, a Bluepharma possui ainda um armazém no Parque Industrial de Taveiro.

A investigação e desenvolvimento de medicamentos de elevado valor acrescentado, bem como a constante aposta na qualidade e inovação dos seus processos de fabrico e comercialização traduzem a principal missão da empresa. Para isso, as prioridades estratégicas passam pelo investimento contínuo em inovação, internacionalização para novos mercados, parcerias que assegurem a rápida permuta de conhecimentos e a qualidade certificada. A qualidade, excelência, competência e inovação são os valores transparecidos pela Bluepharma.<sup>2</sup>

### 2.1. DEPARTAMENTO DE QP&C

O departamento de QP&C encontra-se situado no edifício sede da Bluepharma. Tal como foi referido anteriormente, este é liderado pela Dra. Maria Teresa Murta. Para facilitar a dinâmica de trabalho e a distribuição de tarefas, o departamento encontra-se dividido em grupos de trabalho (Anexo I).

As atividades do departamento de QP&C incluem, mas não exclusivamente, libertação de produtos, gestão dos Acordos de Qualidade, verificação da *compliance* dos produtos, gestão da documentação interna, gestão de alterações e de risco, gestão de desvios, elaboração de *Product Quality Review* (PQR) – principal tarefa que desempenhei no estágio curricular –, qualificações/calibrações/validações, supervisão e controlo dos processos da fabricação, estudos de  *Holding-time* e acompanhamento de auditorias. Também é importante realçar que todo o departamento recebe formação frequente no âmbito das suas responsabilidades.<sup>3</sup>

### 3. ANÁLISE SWOT

Em detrimento dos relatórios de estágio habituais, foi-nos pedido uma análise SWOT relativa a, pelo menos, frequência do estágio, integração dos conhecimentos na prática profissional e adequação do MIFC às perspetivas futuras. Para tal, é fundamental começarmos por entender este conceito relativamente recente.

O termo “SWOT” consiste num acrónimo formado pelas letras iniciais de *Strengths* (pontos fortes), *Weaknesses* (pontos fracos), *Opportunities* (oportunidades) e *Threats* (ameaças). Desta forma, uma análise SWOT compreende quatro componentes organizados em duas dimensões. Neste caso, iremos considerar uma dimensão interna ao estágio, que incluirá os pontos fortes e fracos diretamente relacionados com o mesmo, e uma dimensão externa ao estágio, que incluirá as oportunidades e as ameaças presentes no meio envolvente. A análise SWOT é uma poderosa ferramenta de estratégia e gestão utilizada normalmente por organizações/empresas. Porém, pode ser aplicada em qualquer contexto, nomeadamente num estágio curricular, permitindo refletir acerca do trabalho desenvolvido.<sup>4</sup>

#### 3.1. PONTOS FORTES

##### Ambiente familiar do departamento

O sentimento de integração é de fundamental importância para aproveitar ao máximo todas as oportunidades que surgem. Por este motivo, os Recursos Humanos da Bluepharma fazem questão de acompanhar todos os estagiários e novos colaboradores aos diversos departamentos da empresa, de forma a serem devidamente apresentados e acolhidos por esta grande família. De facto, toda a empresa revela profissionalismo, competência e integridade, mas foi essencialmente no departamento de QP&C que eu encontrei um enorme espírito de equipa, boa disposição e amizade. Para além disso, no decorrer do estágio foram muitas as questões levantadas devido à disponibilidade de toda a equipa, que nunca hesitou em prestar ajuda e transmitir conhecimentos.

##### Formações frequentes

A Bluepharma faz uma grande aposta na formação inicial e contínua de todos os seus colaboradores, inclusive nas mais variadas áreas. Neste sentido, frequentei diversas



formações internas, podendo estas dividir-se em dois tipos: a) Formações gerais, que se destinam a todos os colaboradores e que possuem um foco mais abrangente ou um cariz meramente acolhedor (Anexo 2); b) Formações específicas do departamento, inclusive ações de formação dirigidas aos operadores da Fabricação cujo principal objetivo foi sensibilizar relativamente aos aspetos mais críticos dos processos (Anexo 3). No meu ponto de vista, este último tipo de formações foi o mais relevante, na medida em que me permitiu perceber as restantes funções e o *modus operandi* do departamento de QP&C. Não obstante, todos os ensinamentos foram importantes para compreender a dinâmica de trabalho, a estratégia de negócio e todas as atividades desenvolvidas na empresa.

É importante realçar que todas as formações foram prestadas por colaboradores ao invés de palestrantes externos, o que enfatiza o facto de que o conhecimento não é estanque. Na verdade, cabe-nos a nós, como futuros profissionais de saúde, procurarmos constantemente saber mais.

### Elaboração de PQR

Tal como foi anteriormente mencionado, o meu estágio consistiu na elaboração de PQR (Relatórios de Qualidade do Produto). O PQR é um requisito das Boas Práticas de Fabrico e é redigido tendo em consideração todos os lotes produzidos, de um determinado produto, no decorrer de um ano. Para além de compilar dados relativos ao fabrico e à qualidade de um medicamento, o PQR inclui também uma análise estatística dos mesmos, visando verificar a consistência dos processos e a adequação das especificações, realçar tendências e identificar possibilidades de melhoria.<sup>5</sup>

A elaboração deste documento permitiu-me adquirir vastos conhecimentos, nomeadamente a perceção geral de todo o circuito de fabrico de um medicamento, familiaridade com a documentação utilizada na Indústria Farmacêutica, utilização de novos *softwares*, bem como o contacto com as análises efetuadas no departamento de Controlo da Qualidade. De um modo geral, posso concluir que esta tarefa, aliada a algumas visitas efetuadas ao departamento da Produção com acompanhamento dos processos, me permitiu consolidar os conhecimentos adquiridos na unidade curricular de Tecnologia Farmacêutica I e conhecer a realidade da Indústria Farmacêutica.

## Aquisição de novas competências e melhoria de competências existentes

Tendo estado integrada numa indústria, particularmente numa empresa com mais de 900 milhões de unidades vendidas, 120 clientes internacionais e 500 colaboradores, seria expectável a aquisição de competências em *softwares* até então desconhecidos por mim. De facto, de forma a agilizar a gestão de matérias-primas, lotes produzidos e todos os restantes recursos empresariais, a Bluepharma implementou, em 2007, o *software* SAP ERP®, com o qual tive oportunidade de contactar através de algumas transações. Já o sistema documental é gerido pelos *softwares* Ennov Doc® e Ennov Process®, aos quais dediquei inúmeras horas de trabalho em virtude da tarefa que me foi atribuída. Também a análise estatística requerida nos PQR me permitiu adquirir experiência com o *software* JMP I4®.

Por outro lado, foi-me possível reforçar algumas competências pré-existentes, nomeadamente a língua Inglesa e o Microsoft Excel®. Como conclusão, considero este estágio uma experiência bastante enriquecedora na medida em que obtive ferramentas fora do âmbito do MICF, mas essenciais no mundo do trabalho.

### 3.2. PONTOS FRACOS

#### Duração do estágio

Na minha opinião, sendo a Indústria Farmacêutica uma área tão complexa e rica em processos, o estágio decorreu num tempo inferior ao desejável. Apesar de a aprendizagem ter sido significativa e de ter aproveitado ao máximo todas as oportunidades que me foram oferecidas, a duração do estágio pareceu-me insuficiente. Este sentimento deriva, sobretudo, do facto de que a autonomia e o espírito crítico só foram atingidos praticamente no término do estágio.

#### Auditorias externas

Um dos momentos de maior nervosismo e seriedade de qualquer Indústria Farmacêutica são as auditorias externas. Estas consistem em processos sistemáticos, documentados e independentes cujo objetivo é obter evidências de que todos os critérios e requisitos são cumpridos. As auditorias externas são conduzidas por clientes, entidades certificadoras ou agências governamentais.<sup>6</sup> Sendo a Bluepharma certificada segundo as normas NP EN ISO 9001:2015, NP EN ISO 14001:2015, NP 4457:2007, OHSAS

I8001:2007/NP 4397:2008, Regulamento (CE) n° 1221/2009 (EMAS), entre outras, as auditorias externas são evidentemente frequentes.<sup>2</sup> Apesar de ter presenciado a preparação da equipa do departamento de QP&C para encarar os auditores, devido à minha inexperiência e à importância destas visitas, não tive oportunidade de acompanhar auditorias durante o meu estágio.

### 3.3. OPORTUNIDADES

#### Dilemas do Mocho

Os Dilemas do Mocho são um conjunto de enigmas que estimulam fortemente tanto a capacidade intelectual como o espírito de equipa. A edição deste ano, em que tive a honra de participar, teve como tema “*Blue Ocean*”. Sendo uma competição com uma duração de seis semanas e com uma elevada componente de estratégia empresarial, representou um desafio pessoal que me manteve motivada e criativa, contribuindo para as capacidades de comunicação e resolução de problemas.

#### “Vá para fora cá dentro”

O programa “Vá para fora cá dentro” permite a todos os colaboradores experienciar um dia num departamento diferente, acompanhando a sua rotina diária. Neste sentido, foi-me permitido testemunhar um dia de trabalho no departamento de Controlo de Qualidade. Para além de ter observado a execução de tarefas, assisti a formações específicas deste departamento (Anexo 4). Considero este ponto uma excelente oportunidade na medida em que contribuiu para a compreensão de alguns tópicos abordados no PQR e para a complementação do meu estágio curricular.

#### Metodologia Lean 6 Sigma

Tal como muitas outras empresas de renome, a Bluepharma tem vindo a desenvolver um Projeto *Lean*, baseado na Metodologia *Lean 6 Sigma*. Desta forma, através de uma parceria entre o Kaizen Institute e uma equipa interna Bluelean, têm sido implementadas diversas medidas de melhoria contínua, onde surgem como exemplos o *Kaizen* Diário, as auditorias *Kamishibai* e a Matriz X. No decorrer do meu estágio, tive oportunidade de

presenciar e analisar todas estas medidas, percebendo a importância da criação de fluxos de tarefas, orientação de processos sob *feedback* permanente e do compromisso entre os colaboradores e as suas funções.

### Preocupação com a satisfação dos colaboradores

Desde cedo percebi a preocupação que a Bluepharma tem para com os seus colaboradores. De facto, são imensas as pequenas medidas que contribuem para o bem-estar e satisfação dos colaboradores, surgindo como exemplos a cedência de uma refeição diária completa, chá, café e fruta, a marcação de consultas de Enfermagem e de Medicina no Trabalho e o fornecimento de todo o material necessário às tarefas a realizar, desde computadores pessoais até aos equipamentos de proteção individual.

Para além de tudo isto, a Bluepharma faz questão de organizar atividades lúdicas e de cariz cultural. Como estagiária, usufruí de alguns benefícios: a) participei em *workshops* de Expressão Dramática e de Yoga do Riso organizados, respetivamente, pelo professor João Janicas e pela Escola do Riso (celebração do 18º aniversário da Bluepharma, no dia 1 de Março); b) participei numa Ação Magistral de Cuidados da Pele organizada pela Mary Kay® Cosmetics (celebração do Dia da Mulher, no dia 8 de Março); c) assisti a um Festival de Tunas (oferta de bilhetes e uma agenda cultural). A meu ver, todas estas medidas revelam estima e respeito pelo próximo.

### Apresentação do trabalho realizado

Uma das preocupações mostradas pela Dra. Maria Teresa Murta foi receber o meu *feedback* acerca do trabalho desenvolvido durante o estágio. Desta forma, foi-me pedida a elaboração de uma apresentação destinada ao departamento de QP&C. Nesta reunião pude resumir todas as tarefas realizadas e as competências adquiridas, bem como agradecer por todo o acolhimento e entreaajuda.

### 3.4. AMEAÇAS

#### Conhecimentos insuficientes de Estatística

Uma das lacunas do MICF consiste nos conteúdos programáticos da Unidade Curricular de Estatística. De facto, esta Unidade Curricular não aborda *softwares* estatísticos nem conceitos de estatística avançada, nomeadamente a análise da capacidade e *performance* dos processos. É, no entanto, importante realçar que esta ameaça foi sentida meramente porque estes conhecimentos foram requeridos durante a elaboração de PQR. Isto faz-me depreender, uma vez mais, que o saber não ocupa lugar. Na verdade, é fundamental sermos proactivos na aquisição de bases e ferramentas imprescindíveis na nossa profissão.

#### **4. CONCLUSÃO**

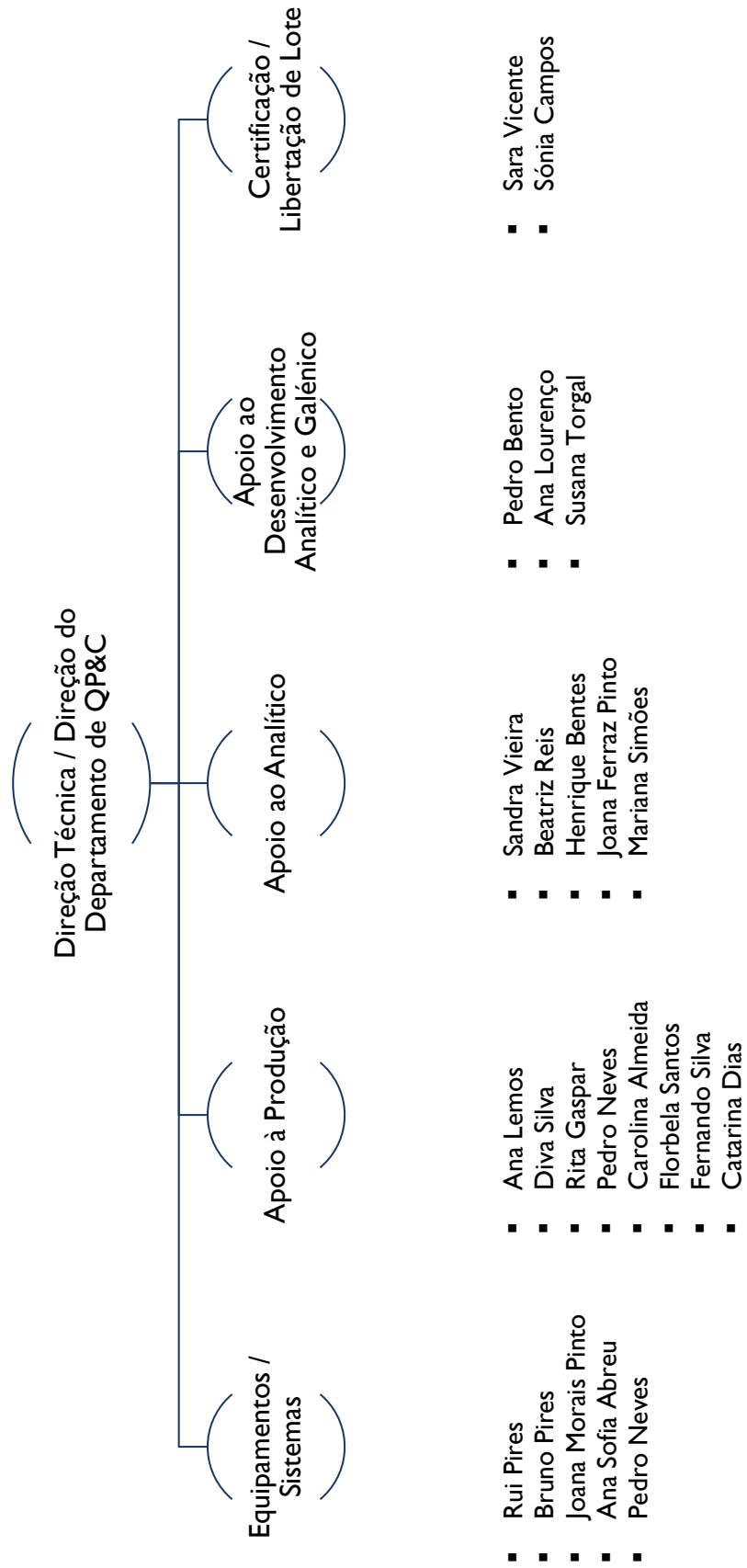
Tendo em conta tudo o que foi previamente referido, posso concluir que o estágio curricular em Indústria Farmacêutica foi uma mais-valia para integrar todas bases que o MICF me facultou na prática profissional. Apesar de ter necessitado de alguns conhecimentos fora do âmbito das Ciências Farmacêuticas, considero o curso bastante completo e adequado, uma vez que a interdisciplinaridade me proporcionou um currículo atual e com bastante empregabilidade.

Considero a frequência deste estágio de primordial importância, tanto no sentido de colocar em prática os ensinamentos como para descobrir uma potencial saída profissional. No meu caso, tornou-se ainda maior o meu interesse em ingressar neste mercado de trabalho.

## 5. BIBLIOGRAFIA

1. Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos. Diário da República: 1.ª Série, n.º173. 4 de setembro de 2015. [consultado a 24 de março de 2019]. Disponível em [http://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/doc9992\\_29465282759230d567eeeb.pdf](http://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/doc9992_29465282759230d567eeeb.pdf)
2. MESQUITA, M. – **Manual do Sistema de Gestão Integrado**. Coimbra: Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., 2019.
3. MURTA, T. – **Ficha de caracterização do Processo - Qualidade do Produto e Compliance**. Coimbra: Bluepharma Indústria Farmacêutica S.A., 2019.
4. GÜREL, E., MERBA, T. – **SWOT Analysis: a Theoretical Review**. The Journal of International Social Research. 2017; 10(51), 994-1006.
5. SANJEEVAIAH, N., MUNAGA, S. – **Annual product quality review: Guidance for industry by regulatory perspective**. International Journal of Medicine Research. 2017; 2(4), 1-10.
6. Comissão Técnica de Normalização CT 80 “Gestão da Qualidade e Garantia da Qualidade” – **NP EN ISO 9000:2015 Sistemas de gestão da qualidade Fundamentos e vocabulário**. Lisboa: Instituto Português da Qualidade, 2015.

Anexo I – Organigrama do departamento de QP&C





## Anexo 2 – Formações gerais

<b>Data</b>	<b>Tema</b>	<b>Formador(es)</b>
07/01/2019	Comunicação com a informática	André Brites
11/01/2019	Sistema de Gestão Integrado: Qualidade e Boas Práticas de Fabrico	Mariana Veiga
14/01/2019	Noções Básicas de Farmacovigilância	Raquel Faria
21/02/2019	Sessão de Acolhimento	Dr. Paulo Barradas
25/02/2019	Ambiente, Saúde e Segurança no Trabalho	Helena Correia
06/03/2019	Visita às Instalações: Fabricação, Embalagem, Desenvolvimento Analítico e Galénico, Controlo de Qualidade e Armazém	Mariana Veiga
11/03/2019	Planeamento e Gestão da Produção: Melhoria Contínua (Metodologia Lean 6 Sigma)	André Carvalho
12/03/2019	Introdução aos Assuntos Regulamentares	Catarina Madanêlo
14/03/2019	Acolhimento & Integração	Luís Silva
15/03/2019	Sistema de Gestão da Investigação, Desenvolvimento e Inovação na Bluepharma	Cláudia Silva
18/03/2019	Políticas na Utilização dos Recursos Informáticos	Miguel Ribeiro
28/03/2019	Entrevista de fim de estágio	Mariana Ambrósio

Anexo 3 – Formações específicas do departamento de PQ&C

<b>Data</b>	<b>Tema</b>	<b>Formador(es)</b>
08/01/2019	Boas Práticas de Documentação*	Ana Lemos
11/01/2019	QP&C: Grupo de Apoio ao Desenvolvimento Analítico e Galénico	Pedro Bento / Ana Lourenço
15/01/2019	Formação Geral do Departamento de Qualidade do Produto & Compliance	Maria Teresa Murta
16/01/2019	QP&C: Grupo da Certificação e Libertação de Lotes	Sara Vicente
16/01/2019	QP&C: Grupo do Apoio à Produção - Reclamações Técnicas	Fernando Silva
17/01/2019	QP&C: Grupo do Apoio ao Analítico - Especificações de Matérias-Primas	Joana Ferraz Pinto / Beatriz Reis
24/01/2019	QP&C: Grupo do Apoio à Produção - Visita à Embalagem	Pedro Neves
29/01/2019	QP&C: Grupo dos Equipamentos e Sistemas - Qualificação de Equipamentos e Validação de Limpeza	Ana Sofia Abreu
01/02/2019	Contaminação Cruzada*	Rui Pires
05/02/2019	QP&C: Grupo do Apoio à Produção – Validações	Diva Silva
13/03/2019	Apresentação e discussão dos resultados da monitorização dos Desvios de Fabrico relativos a Janeiro e Fevereiro de 2019*	Ana Lemos / André Carvalho
20/03/2019	Nova Transação SAP: zpp18	Carolina Almeida
25/03/2019	QP&C: Grupo de Apoio ao Analítico - Gestão de Desvios e OOS	Henrique Bentes
25/03/2019	QP&C: Grupo do Apoio à Produção - PBR e PQR de Produto Acabado	Catarina Dias
25/03/2019	QP&C: Grupo dos Equipamentos e Sistemas - Qualificação dos Equipamentos de Laboratório	Joana Morais Pinto
26/03/2019	Investigação de Desvios	Carolina Almeida

\* Ações de formação dirigidas aos operadores da Fabricação

Anexo 4 – Formações específicas do departamento de Controlo de Qualidade

<b>Data</b>	<b>Tema</b>	<b>Formador(es)</b>
07/03/2019	Amostragem	Telmo Costa
07/03/2019	Dissolução	Maria Barreira
07/03/2019	Microbiologia	Ana Paula Reis
07/03/2019	Análises Físico-Químicas	Isabel Duarte

## RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA



## **ABREVIATURAS**

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

## I. INTRODUÇÃO

O estatuto da Ordem dos Farmacêuticos, determinado pelo Decreto-Lei n.º 131/2015, no artigo 78.º (Princípios gerais de conduta profissional), refere o seguinte: «O farmacêutico é um agente de saúde, cumprindo-lhe executar todas as tarefas relativas aos medicamentos, [...] bem como as ações de educação dirigidas à comunidade no âmbito da promoção da saúde e prevenção da doença [...]».<sup>1</sup> De facto, o papel desempenhado pelo Farmacêutico na Farmácia Comunitária consiste, presentemente, em muito mais do que a mera dispensa de medicamentos. Na verdade, o Farmacêutico assume extrema importância na educação da população relativamente à adoção de estilos de vida saudáveis e ao uso racional dos medicamentos, bem como no aconselhamento aquando da utilização de medicamentos não sujeitos a receita médica.<sup>2</sup>

A propósito de completar a nossa formação em Ciências Farmacêuticas e de reconhecer o título de Farmacêutico, o Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) pressupõe a realização de estágio curricular em Farmácia Comunitária. Desta forma, o meu estágio decorreu na Farmácia Alves, sob a notável orientação da Dra. Elisabete Alves – proprietária e diretora técnica – e do Dr. José Ganilho – farmacêutico. Tal como efetuado no relatório de estágio prévio, todo o trabalho desenvolvido e vivências em Farmácia Comunitária serão analisados segundo um formato SWOT. Será também feita uma breve exposição de alguns casos práticos que, no meu entender, foram pertinentes e valorizaram a minha aprendizagem.

## **2. FARMÁCIA ALVES**

A Farmácia Alves encontra-se aberta ao público desde 2011, tendo uma posição privilegiada uma vez que constitui a primeira e única farmácia na antiga freguesia de São Paulo de Frades. A equipa integra cinco elementos, sendo liderada pela Dra. Elisabete Alves (Anexo I).

A estreita relação de confiança e a satisfação contínua dos utentes traduzem a principal missão desta farmácia. O profissionalismo e a atitude positiva são os principais valores transparecidos.

As atividades desenvolvidas no decorrer do estágio incluem, mas não exclusivamente, atendimento ao público e aconselhamento farmacêutico, prestação de serviços farmacêuticos e determinação de parâmetros bioquímicos, preparação e registo de manipulados, gestão de encomendas e devoluções, controlo e verificação de receituário, gestão de entregas ao domicílio, conferência de resumos de faturas, controlo de prazos de validade, gestão de reservas, organização e arrumação do armazém, auditoria de stocks e comprometimento com a melhoria contínua da farmácia.<sup>3</sup>

### 3. ANÁLISE SWOT

Analogamente ao que foi descrito no Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica, a análise SWOT consiste em identificar pontos fortes, pontos fracos, oportunidades e ameaças sentidas no decorrer do estágio curricular, desta vez em Farmácia Comunitária. Assim, procederei a uma análise fundamentada destes quatro componentes.<sup>4</sup>

#### 3.1. PONTOS FORTES

##### Equipa técnica

É sabido que as relações interpessoais são importantes em qualquer ocupação profissional. No entanto, estas são fulcrais num local de trabalho em que haja interação com o público. Um dos aspetos que mais distingue a Farmácia Alves é, sem dúvida, a equipa técnica altamente qualificada, proactiva e comunicativa. Tais qualidades, aliadas ao número reduzido de elementos integrantes da equipa e à ausência de outros estagiários, tornaram o meu processo de integração uma tarefa bastante espontânea. De facto, o rápido estabelecimento de fortes amizades, o enorme espírito de entreatajuda e a inteira disponibilidade de todos os elementos contribuiu para me sentir confortável no esclarecimento de quaisquer dúvidas.

##### Experiência prévia na medição de parâmetros bioquímicos

As farmácias portuguesas podem prestar uma panóplia de serviços farmacêuticos para promover a saúde e bem-estar dos seus utentes.<sup>5</sup> Um dos serviços prestados na Farmácia Alves é a medição de parâmetros bioquímicos, entre os quais a glicémia, o colesterol total e a pressão arterial, e subsequente aconselhamento farmacêutico. Enquanto estagiária, esta tarefa foi encarada com confiança devido às bases teóricas assimiladas na prévia formação em deteção e controlo dos fatores de risco das doenças cardiovasculares, proporcionada pela Fundação Portuguesa de Cardiologia, bem como à experiência adquirida com a realização de rastreios cardiovasculares.



## Aquisição e consolidação de conhecimentos

Comparando este estágio com o efetuado em Indústria Farmacêutica, concluo que a natureza dos conhecimentos adquiridos diverge bastante. De facto, o estágio em Farmácia Comunitária possui um foco na fase final do ciclo de vida do medicamento, nomeadamente na dispensa e utilização.<sup>6</sup> Desta forma, tornou-se fulcral integrar conhecimentos das diversas unidades curriculares em contexto real de aconselhamento farmacêutico, o que requereu rever conteúdos continuamente. Para além disso, ao deparar-me com uma infinidade de casos práticos, surgiu a necessidade de explorar novas áreas para adquirir bases teóricas adicionais. Considero este aspeto um ponto forte na medida em que proporcionou um enriquecimento da minha formação académica.

## Fontes de informação disponíveis

O Decreto-Lei n.º 75/2016 define, no artigo 37.º, que as farmácias devem dispor, nas suas instalações, da Farmacopeia Portuguesa para consulta regular.<sup>7</sup> No entanto, no decorrer do meu estágio, foi evidente a necessidade de consulta de múltiplas fontes de informação para enriquecer os meus conhecimentos científicos e esclarecer todas as dúvidas pontuais, nomeadamente a base de dados *online* “Infomed” do INFARMED, a aplicação informática SIFARMA 2000®, o Prontuário Terapêutico e ainda os Fluxogramas de Indicação Farmacêutica desenvolvidos pela Associação Nacional das Farmácias. Para além disso, existe também à disposição de toda a equipa o Manual de Eficiência Operacional, tanto em formato físico como digital. Este manual consiste em instruções simples – *One Point Lesson* – que têm como objetivo facilitar as tarefas diárias exercidas na farmácia relativamente ao *script* de atendimento, prestação de serviços, gestão de *stocks*, conferência de receituário, gestão administrativa e de recursos humanos, campanhas em vigor, equipamentos, funcionamento do laboratório e abertura/fecho da farmácia. Considero a existência deste manual de extrema importância, uma vez que garante a uniformização de todos os procedimentos e a minimização de erros.

## Utentes fidelizados

A fidelização é muito mais do que o reconhecimento profissional; passa pela atitude positiva, pelo sincero “bom dia”, bem como pela atenção prestada nos atendimentos. Os

utentes fidelizados representam, nitidamente, uma grande percentagem da faturação da Farmácia Alves. Se estes utentes, por um lado, pertencem a um subgrupo mais recetivo ao aconselhamento farmacêutico, por outro lado, toleram melhor os erros cometidos e a inexperiência de um estagiário. Felizmente, tive o privilégio de lidar com utentes que procuraram ouvir a minha opinião e que não hesitaram em partilhar os seus receios e dúvidas, tendo sido bastante motivante.

### Confiança e autonomia depositadas

Segundo a Dra. Elisabete Alves, “*O segredo para aprender é balcão, balcão e balcão*”. De facto, rapidamente a direção técnica me confiou a tarefa de atender ao público de forma autónoma. Apesar da óbvia inexperiência nesta tarefa de enorme responsabilidade, estive integrada numa equipa sempre disposta a esclarecer eventuais dúvidas e a auxiliar nos atendimentos mais difíceis. Pessoalmente, encarei esta técnica de ensino inicialmente com nervosismo, mas admito que contribuiu para a rápida evolução do meu desempenho.

## 3.2. PONTOS FRACOS

### Duração do estágio

Uma vez que realizei, previamente, um estágio em Indústria Farmacêutica com uma duração de três meses, as horas de estágio em Farmácia Comunitária ficaram confinadas a um menor período. Apesar de sentir que a experiência foi insuficiente para confrontar todos os cenários e casos clínicos possíveis, aproveitei todas as oportunidades de aprendizagem, adquiri novas competências e desenvolvi as ferramentas necessárias para exercer a atividade farmacêutica.

### SIFARMA 2000®

O SIFARMA 2000® consiste numa ferramenta informática de gestão e atendimento presente em cerca de 90% das farmácias portuguesas. Sendo uma aplicação desenvolvida por farmacêuticos, pretende suportar a prática farmacêutica.<sup>8</sup> Contudo, apesar de fornecer informação científica completa de praticamente todos os produtos e de evitar erros durante a dispensa, o seu formato não é, de todo, intuitivo, chegando mesmo a ser antiquado. Desta

forma, senti que o foco e a atenção no utente não foram, inicialmente, os mais desejáveis. Felizmente, esta dificuldade foi ultrapassada com a prática.

### 3.3. OPORTUNIDADES

#### Formações externas

No decorrer do meu estágio muitas foram as oportunidades de frequentar formações externas, tendo sido prestadas por profissionais qualificados – farmacêuticos, médicos e delegados de informação médica – ou assistidas sob um formato *online* (Anexo 2). Todas as formações foram consideradas bastante pertinentes e úteis, uma vez que me permitiram conhecer inúmeros medicamentos não sujeitos a receita médica e atitudes a adotar em certas patologias e condições. Desta forma, foram-me transmitidas bases para efetuar aconselhamentos cientificamente fundamentados. É necessário, porém, realçar a importância do espírito crítico durante as formações, na medida em que muitas vezes o objetivo destas é incentivar o Farmacêutico a aconselhar marcas em específico.

#### Preparação de medicamentos manipulados

No decorrer do meu estágio, pude realizar três medicamentos manipulados, nomeadamente uma pomada de Dermovate® e ácido salicílico, uma solução alcoólica de ácido bórico à saturação e uma pomada de ureia. Encaro este ponto uma oportunidade uma vez que pude colocar em prática os conhecimentos adquiridos em Farmácia Galénica, obedecer às Boas Práticas de Preparação de Medicamentos Manipulados<sup>9</sup> e preencher a Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados (Anexo 3).

#### Forte procura por medicamentos de uso veterinário

Estando localizada numa zona predominantemente rural, a Farmácia Alves possui muitos clientes portadores de animais domésticos. Adicionalmente, foi notório o elevado número de voluntários de associações de proteção a animais de companhia. Posto isto, deparei-me com uma forte procura por medicamentos de uso veterinário, nomeadamente anticoncetivos para felinos, champôs farmacológicos para tratamento de diversas infeções, desparasitantes para aves, felinos e canídeos, entre outros.

Por outro lado, tendo o meu estágio decorrido no período de transição da primavera para o verão, surgiu uma oportunidade de instruir a população no que diz respeito às zoonoses e respetivas medidas de prevenção. Por tudo o que foi referido, considero que enriqueci bastante as minhas bases relativamente a preparações de uso veterinário.

### Dinamização da farmácia

Uma das tarefas que fiz questão de auxiliar, devido às minhas competências em *softwares* de imagem, foi a dinamização da farmácia através da elaboração de cartazes e vídeos promocionais e da publicação de “Dicas da Farmácia” na página de *Facebook* (Anexos 4A, 4B, 4C, 4D e 4E). Decorrente destas publicações, surgiu a ideia de um passatempo para difundir a referida página, captar a atenção das classes etárias mais jovens e avaliar a assimilação da informação transmitida à população (Anexos 5 e 6). O *feedback* da equipa demonstrou satisfação face ao meu contributo.

### Diversidade de tarefas desenvolvidas

Durante todo o período de estágio, o processo de tutoria foi organizado, fluido e planeado de uma forma extremamente flexível, de forma a assegurar que todas as atividades desenvolvidas contribuíssem para a minha evolução enquanto estagiária e futura farmacêutica.

As semanas iniciais decorreram, praticamente na sua totalidade, no *backoffice*. Desta forma, as primeiras tarefas consistiram em rececionar encomendas, gerir devoluções, organizar produtos, controlar os prazos de validade, auditar *stocks* e preparar medicamentos manipulados. Gradualmente, comecei a realizar tarefas de maior responsabilidade, tais como tratar dos pedidos ao domicílio e conferir o receituário, o que me permitiu conhecer os diferentes planos de participação e complementaridades aos mesmos. Por fim, contactei com os utentes através do atendimento ao público, incluindo aconselhamento farmacêutico e determinação de parâmetros bioquímicos.

Posso concluir que a diversidade de funções atribuídas fez parte de uma orientação adequada e elucidativa daquilo que é a atividade farmacêutica.

### 3.4. AMEAÇAS

#### Inexperiência e lacunas do plano de estudos do MICF

Ao longo do estágio foi óbvia a falta de conhecimentos em diversas áreas, principalmente pediatria, ortopedia, nutrição clínica e, inclusive, técnicas de comunicação. Considero, contudo, esta lacuna no plano de estudos do MICF inevitável na medida em que o curso já é bastante exaustivo *per si*, tornando impossível uma abordagem completa a todos os tipos de produtos comercializados numa farmácia. Por outro lado, foi também notória a inexperiência na validação de receitas manuais e no reconhecimento de nomes comerciais, tendo sido bastante difícil associar o nome de alguns medicamentos aos respetivos princípios ativos. Apesar de tudo, penso ter adquirido experiência e *soft skills* fundamentais para ultrapassar todas as dificuldades sentidas.

#### Iliteracia da população

Uma das maiores adversidades com que me deparei foi a acentuada iliteracia da população. De facto, a diferença abismal, em termos de linguagem científica, entre os profissionais de saúde e a população em geral e as ideias preconcebidas – muitas vezes erróneas – da população sénior dificultam bastante o dever do Farmacêutico enquanto promotor de saúde pública.<sup>1</sup> Assim, é necessário um ajuste constante do discurso técnico consoante o indivíduo com que contactamos.

Por outro lado, também os medicamentos genéricos são vistos com bastante descrença por parte de alguns subgrupos, remanescendo para o Farmacêutico o dever de esclarecer quanto ao processo de desenvolvimento dos medicamentos. Encarei esta tarefa com relativa facilidade devido ao facto de ter estagiado previamente numa Indústria Farmacêutica e, particularmente, de genéricos.

Por último, reparei que a comunidade desconhece o processo de comparticipação dos medicamentos e o fenómeno de exportações paralelas, o que leva a várias situações constrangedoras, tais como o sentimento de engano resultante da alteração dos preços dos medicamentos ou a sensação de má gestão do *stock* por parte da farmácia quando há produtos esgotados.

## 4. CASOS PRÁTICOS

### Caso Prático 1

Uma mulher pediu algo para tratar as aftas da filha, que tem 5 meses de idade. Com algumas perguntas, percebi que as lesões eram proeminentes e apresentavam pontos brancos, pelo que seria mais provável a bebé ter “sapinhos” ou estomatite aftosa. Foi recomendado aplicar 1 mL de Mycostatin<sup>®</sup> (suspensão oral contendo nistatina) até quatro vezes por dia sobre as lesões. Informei que, caso estas não desaparecessem em duas semanas, seria necessário recorrer ao médico.

### Caso Prático 2

Um homem com cerca de 30 anos apresentava crise hemorroidária com sangramento. Os sintomas fizeram-no recorrer ao médico de família, que lhe prescreveu Daflon 500<sup>®</sup> (comprimidos revestidos por película contendo bioflavonoides) e Faktu<sup>®</sup> (pomada retal contendo policresaleno e cinchocaína). O aconselhamento farmacêutico foi fundamental neste caso prático, nomeadamente no esclarecimento das posologias e de algumas medidas não farmacológicas: a) o Daflon 500<sup>®</sup> deve ser tomado 2+2+2 nos primeiros quatro dias, 2+0+2 nos três dias seguintes e 1+0+1 até terminar a embalagem; b) o Faktu<sup>®</sup> deve ser aplicado sobre as lesões de manhã e à noite, de preferência depois do ato defecatório; c) fazer banhos de “assento” em água tépida durante 15 minutos, de manhã e à noite, ainda antes de aplicar o Faktu<sup>®</sup>, para relaxar o espasmo muscular anal; d) nas crises agudas, lavar a região anorretal com água fria, pois esta provoca um efeito vasoconstritor.

### Caso Prático 3

Uma mulher com cerca de 70 anos sofreu uma lesão no ombro que exigiu a colocação de um suporte de braço com imobilização. Recorreu à farmácia com queixas de insónias, dificuldade em adormecer e stress derivados do uso deste dispositivo médico. Foi, então, recomendado tomar uma cápsula, meia hora antes de deitar, de Stressil Noite<sup>®</sup>, que contém melatonina, valeriana (*Valeriana officinalis*), passiflora (*Passiflora incarnata*), camomila (*Matricaria recutita*) e lúpulo (*Humulus lupulus*). A valeriana é, de facto, a primeira opção em transtornos do sono e ansiedade uma vez que a atividade dos seus extratos está bem documentada em numerosos estudos clínicos, inclusive em combinação com outras plantas. No entanto, o efeito desta manifesta-se de forma gradual (o efeito ótimo só se verifica após tratamento continuado ao longo de duas a quatro semanas). Assim, este produto inclui ainda um indutor de sono para reduzir o tempo necessário para adormecer.

## 5. CONCLUSÃO

O estágio curricular realizado na Farmácia Alves superou, definitivamente, as minhas expectativas. Sempre nos foi ensinado que o Farmacêutico desempenha um importantíssimo papel de agente de saúde pública, mas foi apenas com a prática que eu adquiri o respeito e o apreço por esta saída profissional.

Para além de ter consolidado grande parte dos conhecimentos que nos foram transmitidos no MICF, muitas outras ferramentas foram adquiridas no decorrer deste estágio. Aprendi, por exemplo, a criar empatia e a valorizar problemas e preocupações de desconhecidos. Penso ter evoluído como pessoa, o que não se aprende em nenhum curso.

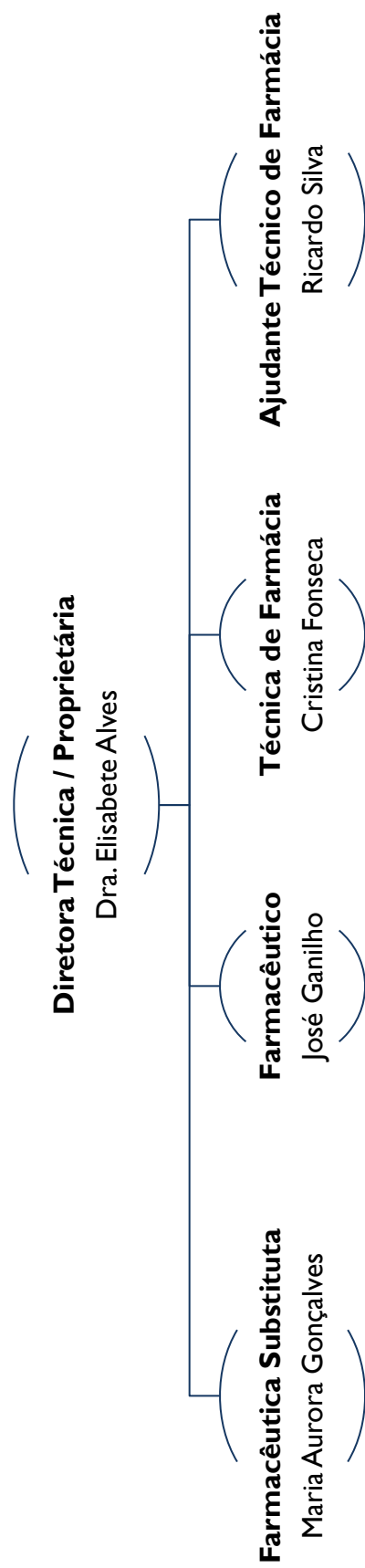
Considero ter realizado todas as tarefas propostas com brio e superado todas as dificuldades com o apoio da equipa técnica, que sempre se mostrou disponível e prestável. Posto isto, concluo que tive uma vivência completa daquilo que é, verdadeiramente, a Farmácia Comunitária.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Estatuto da Ordem dos Farmacêuticos. Diário da República: 1.ª Série, n.º 173. 4 de setembro de 2015. [consultado a 9 de junho de 2019]. Disponível em [http://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/doc9992\\_29465282759230d567eeeb.pdf](http://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/doc9992_29465282759230d567eeeb.pdf)
2. BELL, J., DZIEKAN, G., POLLACK, C., MAHACHAI, V. – **Self-Care in the Twenty First Century: A Vital Role for the Pharmacist**. *Advances in Therapy*. 2016; 33, 1691-1703.
3. ALVES, E. – **Manual de Acolhimento**. Coimbra: Farmácia Alves, 2012.
4. GÜREL, E., MERBA, T. – **SWOT Analysis: a Theoretical Review**. *The Journal of International Social Research*. 2017; 10(51), 994-1006.
5. Portaria n.º 97/2018. Diário da República: 1.ª Série, n.º 69. 9 de abril de 2018. [consultado a 23 de junho de 2019]. Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/115006162>
6. INFARMED – **O ciclo de vida do medicamento explicado aos jovens**. Notícias, 21 de maio de 2019. [consultado a 30 de junho de 2019]. Disponível em [http://www.infarmed.pt/web/infarmed/noticias/-/journal\\_content/56/15786/3169402](http://www.infarmed.pt/web/infarmed/noticias/-/journal_content/56/15786/3169402)
7. Decreto-Lei n.º 75/2016. Diário da República: 1.ª Série, n.º 214. 8 de novembro de 2016. [consultado a 23 de junho de 2019]. Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/75688299>
8. GLINTT – **SIFARMA**. [consultado a 30 de junho de 2019]. Disponível em <https://www.glintt.com/pt/o-que-fazemos/ofertas/SoftwareSolutions/Paginas/Sifarma.aspx>
9. Portaria n.º 594/2004. Diário da República: 1ª Série, n.º 129. 2 de junho de 2004. [consultado a 30 de junho de 2019]. Disponível em <https://dre.pt/application/conteudo/261875>



Anexo I – Equipa integrante da Farmácia Alves




Anexo 2 – Formações externas

Data	Tema	Dinamizador
04/04/2019	Urgências em Otorrinolaringologia	 saúde que se vê
04/04/2019	Olho Vermelho	
10/04/2019	<i>Ginkgo biloba</i> e declínio da Função Cognitiva	 Pharma Nord
11/04/2019	Suplementos Alimentares: Gama BioActivo	
09/05/2019	Proteção Solar & Novidades	 EAU THERMALE Avène
14/05/2019	A minha Fotoproteção*	 ISDIN
20/05/2019	OTC's e Novidades	 GRUPO TECNIMEDE
21/05/2019	<i>Live Young</i> *	 ISDIN
22/05/2019	Novidades Optrex	 Reckitt Benckiser
22/05/2019	Diarreia e Síndrome do Intestino Irritável	 NORGINE
01/06/2019	Tabagismo: abordagem proactiva e aconselhamento breve ao balcão da Farmácia*	 ph+ Desenvolvimento de Potencial Humano
27/06/2019	FAMA: Infecções Vaginais	 GEDEON RICHTER LTD.
02/07/2019	Pulgas, Carraças & Outros	 Boehringer Ingelheim

\*Formações assistidas sob formato *online*

Anexo 3 – Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados

	<h2 style="margin: 0;">Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados</h2>
---	---

**Medicamento:** \_\_\_\_\_

Teor em substância(s) ativa(s): 100g (mL ou unidades) contêm \_\_\_\_g (mL) de \_\_\_\_\_

Forma farmacêutica:

Data de preparação:

Número de lote:

Quantidade a preparar:


Matéria-prima	Nº de lote	Origem	Farma-copeia	Quant. para 100g	Quant. calculada	Quant. pesada	Rubrica do operador	Rubrica do supervisor

**Preparação**

Rubrica do operador

1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	
8.	
9.	
10.	
11.	

### Anexo 3 – Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados (cont.)

 <b>farmácia alves</b> <small>pela sua saúde</small>	<b>Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados</b>
--	--

Aparelhagem usada:

#### **Embalagem**

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


#### **Prazo de utilização e Condições de conservação**

Condições de conservação:	Operador: _____
Prazo de utilização:	Operador: _____

#### **Rotulagem**

1. Proceder à elaboração do rótulo de acordo com o modelo descrito em seguida.	
2. Anexar a esta ficha de preparação uma cópia, rubricada e datada, do rótulo da embalagem dispensada	
<b>Modelo de rótulo</b>	
Identificação da Farmácia Identificação do Diretor Técnico Endereço e telefone da Farmácia	Identificação do Médico prescriptor Identificação do doente
Denominação do Medicamento	
Teor em substância(s) activa(s) Quantidade dispensada Referência a matérias-primas cujo conhecimento seja eventualmente necessário para utilização conveniente Posologia Via de administração	Data de preparação Prazo de utilização Condições de conservação Nº de lote Manter fora do alcance das crianças Advertências Uso externo (caso se aplique)
Operador: _____	

Anexo 3 – Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados (cont.)

 <b>farmácia alves</b> <small>pela sua saúde</small>	<b>Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados</b>
--	--

**Verificação**

Ensaio	Especificação	Resultado	Rubrica do operador
Aprovado <input type="checkbox"/> Rejeitado <input type="checkbox"/>			
Supervisor: _____ / ____ / ____			

**Nome e morada do doente**

--


**Nome do prescriptor**

--

**Anotações**

--

Anexo 3 – Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados (cont.)

 <b>farmácia • alves</b> <small>pelo sua saúde</small>	<b>Ficha de Preparação de Medicamentos Manipulados</b>
--	--

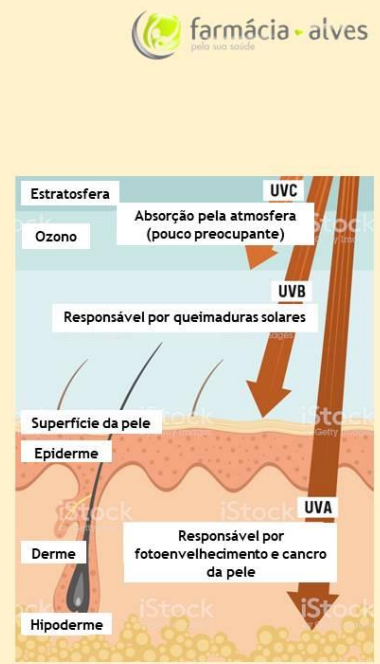
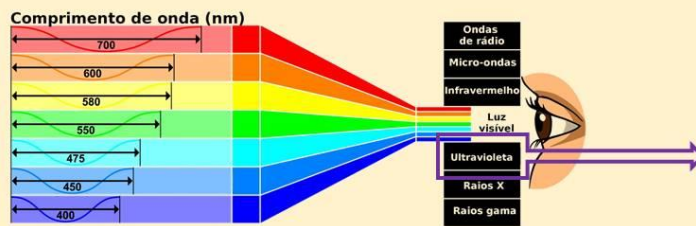
**Cálculo do preço de venda**

<b>MATÉRIAS-PRIMAS:</b>							
Matérias-primas	Embalagem existente em armazém		Preço de aquisição de uma dada quant. unitária (s/ IVA)		Quant. a usar	Factor multiplicativo	Preço da matéria-prima utilizada na preparação
	Quant. adquirida	Preço de aquisição (s/ IVA)	Quant. unitária	Preço			
		€		€	X	X	= €
		€		€	X	X	= €
		€		€	X	X	= €
		€		€	X	X	= €
		€		€	X	X	= €
<b>Total Matéria-Prima (A)</b>							= €
<b>HONORÁRIOS DE MANIPULAÇÃO:</b>							
	Forma Farmacêutica	Quantidade	F (€)	Factor multiplicativo	Valor		
Valor referente à quant. base				X	= €		
Valor adicional			X	X	= €		
<b>Total da Manipulação (B)</b>							= €
<b>MATERIAL DE EMBALAGEM:</b>							
Material de embalagem	Preço de aquisição	Quantidade	Factor multiplicativo	Valor			
	€	X	X	= €			
	€	X	X	= €			
<b>Total de Material de Embalagem (C)</b>							= €
<b>P.V.P. DO MEDICAMENTO MANIPULADO:</b>							
Soma de (A) + (B) + (C)		Factor multiplicativo				Valor	
€		X				= €	
						IVA	+ €
						(D)	= €
<b>DISPOSITIVOS AUXILIARES DE ADMINISTRAÇÃO:</b>							
Dispositivo	Preço unitário	Quantidade	Valor				
			(E) €				
<b>PREÇO FINAL: (D) + (E)</b>							€
Operador: _____ Supervisor: _____							

## O que é a radiação Ultravioleta (UV)?

A radiação UV faz parte do espectro eletromagnético (luz) proveniente do sol que atinge a Terra. Como o comprimento de onda é mais curto que o da luz visível, a radiação UV invisível a olho nu.

A radiação UV divide-se em UVA, UVB e UVC, sendo que só a radiação UVA e UVB atingem a superfície terrestre (a maior parte da radiação UVC é absorvida pela camada do ozono).



## Porque é tão importante aplicar protetor solar diariamente?

Não é só na praia ou na piscina que estamos expostos à radiação ultravioleta (UV) e aos danos cutâneos que esta provoca: “escaldões”, envelhecimento precoce da pele e cancro da pele. Sempre que estamos ao ar livre, seja a trabalhar, caminhar, sentados numa esplanada ou mesmo a conduzir, a radiação solar atinge-nos, até em dias nublados. Por isso é que devemos aplicar protetor solar diariamente, 30 minutos antes de sair de casa.

A textura dos protetores solares tem evoluído de forma a satisfazer diferentes necessidades (por exemplo: os desportistas têm à sua disposição protetores que não escorrem para os olhos com o suor). Aconselhe-se na sua farmácia!



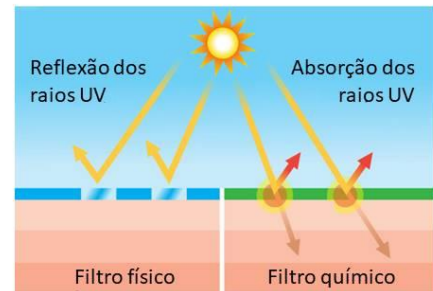
Na imagem acima podemos observar 2 irmãs gêmeas, sendo que o emprego destas era diferente em termos de exposição solar... É notável o fotoenvelhecimento relacionado com a radiação ultravioleta e a falta de proteção solar adequada.



## Anexo 4C – “Dicas da Farmácia”: Dica nº3

Os protetores solares podem conter filtros **químicos**, que **absorvem** a radiação, ou **físicos** (também chamados **minerais**), que **refletem** a radiação. É comum a associação dos 2 tipos de filtros para obter uma melhor proteção.

Em crianças, é aconselhável apenas o uso de filtros físicos pois, os filtros químicos podem desencadear reações alérgicas e de hipersensibilidade.



Um protetor solar apresenta proteção contra a radiação **UVB**, expressa em **FPS** (Fator de Proteção Solar, ex.: 50+, 30+, 20+) e contra a radiação **UVA**, expressa em **PPD** (Persistent Pigment Darkening).

Antes de comprar um protetor solar esteja atento se possui **PPD** e qual o seu valor!

Os protetores solares vendidos na farmácia têm, obrigatoriamente, um valor de **PPD** que seja pelo menos 1/3 do valor de **FPS**. Ou seja, um protetor solar com **FPS 50+** tem, pelo menos, um valor de **PPD** de 17.

## Anexo 4D – “Dicas da Farmácia”: Dica nº4

**farmácia • alves**  
pela sua saúde

**BEBA MUITA ÁGUA**

**EVITE EXPOR-SE AO SOL ENTRE AS 11H E AS 17H**

**APÓS A EXPOSIÇÃO SOLAR APLIQUE CREME HIDRATANTE**

**USE CHAPÉU E ÓCULOS**

**PASSE O PROTETOR SOLAR EM TODO O CORPO 30 MINUTOS ANTES DE SAIR DE CASA**

**2 HORAS REAPLIQUE A CADA**

**60 SPF**








## Anexo 4E – “Dicas da Farmácia”: Dica nº5

### Cancro de Pele

O tipo de cancro de pele mais perigoso, embora menos comum, é o **melanoma**. Tem diversos subtipos e surge, geralmente, entre os 30 e os 50 anos. Na mulher, o local mais habitual é a perna, enquanto no homem costuma surgir na zona do dorso (costas).

**CONHEÇA O ABCDE**

A	B	C	D	E
ASSIMETRIA	BORDAS	COR	DIÂMETRO	EVOLUÇÃO
				
Um lado não é parecido com o outro	Bordas irregulares	Variedade de cores, geralmente tons de preto e marrom	Tamanhos maiores que 6 mm	Mudanças em tamanho, forma, cor; sangramento ou novo sintoma






### Quais os sinais alarmantes?

Em primeiro lugar, deve estar atento a um sinal que tenha surgido ou alterado recentemente. Por outro lado, a regra ABCDE permite-lhe, de forma simples, reconhecer um sinal que deve ser observado pelo médico.

## Anexo 5 – Publicação de divulgação do passatempo “Quiz de verão”



### Regras de participação

-  Colocar LIKE na nossa página de Facebook
-  Identificar 3 amigos(as) nesta publicação
-  Responder corretamente às 5 perguntas

Passatempo disponível até ao dia **12 de Julho**

## Quiz de Verão

Responda a este questionário e habilite-se a ganhar um Anthelios XL Gel-Creme com cor SPF50+ de La Roche-Posay. Para participar, basta colocar LIKE na nossa página de Facebook, identificar 3 amigos(as) na publicação oficial do quiz e responder a 5 perguntas. Escolha a resposta mais correcta, tendo em consideração as dicas partilhadas na nossa página. Boa sorte!

Notas: O prémio destina-se às duas pessoas que responderem corretamente a todas as perguntas. Em caso de empate, será feito um sorteio. Aceitamos respostas até ao dia 12 de Julho.

\*Obrigatório

Endereço de email \*

O seu email

Nome \*

A sua resposta

Relativamente à radiação ultravioleta: \*

- A radiação UVC não provoca queimaduras porque reflete quase na sua totalidade na pele.
- A radiação UVA é responsável pelas rugas e manchas solares.
- A radiação UVC atinge a pele em profundidade.
- A radiação UVA é responsável pelas queimaduras solares.

## Anexo 6 – Passatempo “Quiz de verão” (cont.)

### Aplicar diariamente protetor solar: \*

- É dispensável em dias com nuvens, pois estas absorvem a radiação.
- Deve ser feito, mesmo se não sairmos de casa.
- Já existem diferentes texturas de protetores solares, de forma a ir ao encontro de diferentes necessidades e ocasiões.
- Deve fazer-se imediatamente antes de sair de casa.

### Relativamente aos filtros solares e fatores de proteção: \*

- O valor de PPD pode ser ignorado.
- Aconselham-se filtros físicos para crianças uma vez que são mais resistentes à água.
- Os protetores solares nunca provocam reações alérgicas e de hipersensibilidade.
- Uma combinação de filtros químicos e físicos permite obter uma maior proteção.

### Num dia típico de praia: \*

- A reaplicação de protetor a cada 2 horas é essencial, mesmo estando a maior parte do tempo à sombra do chapéu.
- Não é necessário beber água frequentemente pois a água do mar é suficiente para nos manter hidratados.
- O protetor solar não é necessário na cara, mãos e braços pois são zonas do corpo habituadas à radiação solar.
- Não há problema em almoçar na praia, desde que esteja nublado.

Anexo 6 – Passatempo “Quiz de verão” (cont.)

Quanto ao cancro de pele: \*

- O cancro de pele mais perigoso e mais comum é o melanoma.
- É mais comum na infância.
- Um sinal com bordos irregulares não é preocupante.
- O método ABCDE é das ferramentas mais fáceis de fazer um autoexame da pele.