

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Avaliação das condições de preparação de complexos  
polieletrólíticos utilizando extratos ou polímeros com origem  
marinha

**Dinis Miguel Faleiro Rita**

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Ana Margarida Moutinho Grenha e  
coorientação da Professora Doutora Noelia Flórez Fernández

2022

**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Avaliação das condições de preparação de complexos  
polieletrólíticos utilizando extratos ou polímeros com origem  
marinha

**Dinis Miguel Faleiro Rita**

Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob orientação da Professora Doutora Ana Margarida Moutinho Grenha e  
coorientação da Professora Doutora Noelia Flórez Fernández

**2022**

# Avaliação das condições de preparação de complexos polieletrólíticos utilizando extratos ou polímeros com origem marinha

## **Declaração de autoria de trabalho**

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

---

Copyright© 2022 Dinis Miguel Faleiro Rita

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## Agradecimentos

Quero agradecer acima de tudo aos meus pais e avós que fizeram de tudo para possibilitar a minha vinda para longe de casa e a conclusão dos meus estudos.

Um agradecimento enorme à professora Ana Grenha por toda a sua ajuda na orientação desta dissertação, pela sua sabedoria e pelo gosto que me passou pela Tecnologia Farmacêutica.

Agradeço igualmente à professora Noelia Flórez Fernández pela ajuda na orientação desta dissertação e pela enorme ajuda no laboratório.

Um obrigado a todos do 2.22, em especial ao Jorge Pontes que, para além do excelente amigo que é, foi um pilar de confiança no laboratório. Sem falar nas suas “incríveis” piadas e gosto musical.

A todos os meus amigos de Beja que embora a distância seja difícil continuam a ser isso mesmo, amigos. De todos estes, um obrigado especial ao André Escoval, Miguel Godinho e Vicente Martins.

Gostaria de agradecer à turma de 2017 por tudo o que vivemos e sofremos nos últimos cinco anos. Uma palavra especial para o Tiago Santana, Yana Voroshylova e Ana Rita Costa. Igualmente quero agradecer à turma de 2015 pela maneira como nos receberam de braços abertos.

Por último, quero agradecer do fundo do coração ao Hugo Loja e à Joana Cruz. Não só pela ajuda no estudo, “empurrões” para a frente e puxões de orelhas, mas também por todas as histórias pelas quais passámos (boas e más), pelas pessoas que são e por aquela que me fazem querer ser. Sem vocês nada disto teria o mesmo significado e vou levá-los para a vida.

## Resumo

Os polímeros de origem marinha, como o fucoidan, carragenina e quitosano podem ser utilizados em aplicações muito diversas, seja, por exemplo, como produtos dietéticos ou na cicatrização de feridas. Também têm sido propostos para a produção de sistemas de veiculação de fármacos, como as nanopartículas, tirando vantagem do potencial elevado de biodegradação, biocompatibilidade, baixa toxicidade e das várias atividades biológicas que lhes estão associadas.

As algas são uma das possíveis fontes de polímeros marinhos. Um dos objetivos deste trabalho consistiu em avaliar a capacidade dos extratos de *Sargassum muticum* (FSm) para a formação de nanopartículas poliméricas com quitosano (CS), caracterizando-as quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. Foram variados os raios de massa (FSm/CS = 4/1, 1/1 e 1/4), tendo-se obtido tamanhos compreendidos entre 280 e 1040 nm, índices de polidispersão desde 0,23 a 0,66 e valores de potencial zeta entre +33 e +67 mV. Verificou-se uma tendência de aumento de todos estes parâmetros quando estava presente uma maior concentração de CS e, conseqüentemente, também uma maior concentração total de polímeros.

Para estudar a influência da temperatura de reação nas características físico-químicas das nanopartículas foram produzidas nanopartículas com fucoidan obtido a partir de *Fucus vesiculosus* (FFv) e CS, e também com carragenina (CRG) e CS, fazendo-se uma comparação entre a produção à temperatura ambiente (25 °C) e a uma temperatura controlada (15 °C). As nanopartículas FFv/CS demonstraram que a concentração dos polímeros influenciou as suas propriedades físico-químicas, sendo que os parâmetros analisados (tamanho, índice de polidispersão, potencial zeta) aumentaram com a adição de CS. No entanto, verificou-se que nas nanopartículas CS/FFv o efeito no tamanho e potencial zeta foi o inverso quanto maior a proporção de CS. A comparação dos parâmetros de caracterização das nanopartículas após produção a ambas as temperaturas, indicou que a temperatura de reação não é um fator com muita influência nas características das nanopartículas.

Palavras-chave: carragenina; complexação polieletrólítica; fucoidan; nanopartículas; polímeros marinhos; quitosano

## Abstract

Polymers from marine origin, such as fucoidan, carrageenan and chitosan can be used in very diverse applications, for example as dietary products or in wound healing. They have also been proposed for the production of drug delivery systems, such as nanoparticles, taking advantage of their high potential for biodegradation, biocompatibility, low toxicity, and their various associated biological activities.

Algae are one of the possible sources of marine polymers. One of the objectives of this work was to evaluate the ability of *Sargassum muticum* (FSm) extracts to form polymeric nanoparticles with chitosan (CS), characterizing them in terms of size, polydispersity index and zeta potential. Mass ratios were varied (FSm/CS = 4/1, 1/1 and 1/4), and sizes ranging from 280 to 1040 nm, polydispersity index from 0.23 to 0.66 and zeta potential values between +33 and +67 mV were obtained. There was a tendency for all these parameters to increase when a higher concentration of CS was present and, consequently, also a higher total polymer concentration.

To study the influence of the reaction temperature on the physicochemical characteristics of the nanoparticles, nanoparticles were produced with fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* (FFv) and CS, and also with carrageenan (CRG) and CS, making a comparison between the production at room temperature (25 °C) and at a controlled temperature (15 °C). The FFv/CS nanoparticles showed that the concentration of the polymers influenced their physicochemical properties, with the analyzed parameters (size, polydispersity index, zeta potential) increasing with the addition of CS. However, it was found that in the CS/FFv nanoparticles the effect on size and zeta potential was the reverse the higher the proportion of CS. Comparison of the characterization parameters of the nanoparticles after production at both temperatures indicated that the reaction temperature is not a factor with much influence on the nanoparticle characteristics.

Keywords: carrageenan; chitosan; fucoidan; marine polymers; nanoparticles; polyelectrolytic complexation

# Conteúdo

Índice de figuras .....	viii
Índice de tabelas .....	ix
Índice de siglas .....	x
1. Introdução .....	1
1.1 Macroalgas marinhas.....	1
1.1.1 <i>Sargassum muticum</i> .....	3
1.1.2 <i>Fucus vesiculosus</i> .....	4
1.2 Polímeros de origem marinha .....	5
1.2.1 Fucoïdan.....	5
1.2.2 Alginato.....	7
1.2.3 Carragenina .....	8
1.2.4 Quitosano .....	9
1.3 Métodos de extração para a obtenção de polímeros.....	11
1.4 Nanopartículas.....	13
1.4.1 Nanopartículas poliméricas .....	14
1.4.2 Complexação polieletrólítica.....	16
1.4.3 Caraterização das nanopartículas .....	16
2. Objetivos .....	19
3. Materiais e métodos .....	20
3.1 Reagentes .....	20
3.2 Produção das nanopartículas .....	20
3.2.1 Nanopartículas produzidas com extratos de <i>Sargassum muticum</i> .....	21
3.2.2 Nanopartículas produzidas com fucoïdan de <i>Fucus vesiculosus</i> .....	22
3.2.3 Nanopartículas produzidas com carragenina.....	22
3.3 Caraterização das nanopartículas .....	22
3.4 Análise estatística.....	23
4. Resultados e discussão .....	24
4.1 Caraterização das nanopartículas produzidas com extratos de <i>Sargassum muticum</i> .....	24
4.2 Caraterização das nanopartículas produzidas com fucoïdan de <i>Fucus vesiculosus</i> .....	28
4.3 Caraterização das nanopartículas produzidas a partir de carragenina.....	33
5. Conclusão.....	36
6. Bibliografia .....	38

## Índice de figuras

Figura 1.1 - Exemplo de microalga vista ao microscópio, da espécie <i>Nannochloropsis oculata</i> . Retirado de (6).....	2
Figura 1.2 - Imagens representativas de algas verde, castanha e vermelha, respetivamente. a) <i>Ulva lactuca</i> b) <i>Saccorhiza polyschides</i> c) <i>Plocamium cartilagineum</i> . Retirado de (16-18). ....	3
Figura 1.3 - Alga castanha invasora <i>Sargassum muticum</i> . Retirado de (25). ....	4
Figura 1.4 – Imagem da alga castanha <i>Fucus vesiculosus</i> . Retirado de (34). ....	5
Figura 1.5 - Esquema da possível estrutura do fucoidan, extraído da ordem <i>Fucales</i> , com ligações alternadas $\alpha$ -(1,3) e $\alpha$ -(1,4). (R representa o local de potenciais substituintes, como sulfato, manose, galactose, entre outros). Adaptado de (48).....	6
Figura 1.6 - Representação das duas unidades estruturais que constituem os alginatos, ácido $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido $\alpha$ -L-gulurónico (G). Retirado de (58). ....	7
Figura 1.7 – Estrutura dos três principais tipos de carragenina comercial: kappa, iota e lambda. Adaptado de (13).....	8
Figura 1.8 – Estrutura da quitina que apresenta grupos acetilo (formas azuis), e do quitosano que não os possui (formas vermelhas). Adaptado de (13). ....	10
Figura 1.9 - Esquema do método de extração utilizado nos extratos de <i>Sargassum muticum</i> . (RSL – rácio sólido líquido). ....	13
Figura 1.10 - Representação de algumas das classes de nanopartículas existentes. Adaptado de (116).....	14
Figura 1.11 - Representação de alguns dos sistemas nanoparticulados mais citadas na literatura. Adaptado de (117).....	15
Figura 1.12 - Esquema do efeito Tyndall. Adaptado de (140). ....	17
Figura 3.1 - Esquema da produção de nanopartículas poliméricas utilizando o método de complexação polieletrólítica. ....	21
Figura 4.1 - Tamanho das nanopartículas formuladas a partir dos diferentes extratos de <i>Sargassum muticum</i> e quitosano, com diferentes rácios de massa FSm/CS: 4/1; 1/1; 1/4. Dados representam média $\pm$ desvio padrão; $n \geq 3$ . ....	25
Figura 4.2 - PdI das NP formuladas a partir dos diferentes extratos de <i>Sargassum muticum</i> e quitosano, com diferentes rácios de massa FSm/CS: 4/1; 1/1; 1/4. Dados representam média $\pm$ desvio padrão; $n \geq 3$ . ....	27
Figura 4.3 - Potencial zeta das NP formuladas a partir dos diferentes extratos de <i>Sargassum muticum</i> e quitosano, com diferentes rácios de massa FSm/CS: 4/1; 1/1; 1/4. Dados representam média $\pm$ desvio padrão; $n \geq 3$ . ....	28
Figura 4.4 - Tamanho e potencial zeta das NP FFv/CS 4/1, 1/1 e 1/4 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (n=3). ....	29
Figura 4.5 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/FFv 4/1 e 1/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (n=3). ....	31
Figura 4.6 - Tamanho e potencial zeta das NP FFv/CS 4/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3). ....	32
Figura 4.7 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/FFv 1/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3). ....	33
Figura 4.8 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG 5/1, 4/1 e 3/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (n=3). ....	34
Figura 4.9 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG 4/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3). ....	35
Figura 4.10 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG 3/1 a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3).....	35

## Índice de tabelas

Tabela 3.1 - Condições de temperatura e tempo de aplicação de ultrassons para o processo de obtenção dos nove extratos de <i>Sargassum muticum</i> . .....	20
--	----

## Índice de siglas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

ARN – Ácido Ribonucleico

CRG – Carragenina

CS - Quitosano

FFv – Fucoïdan proveniente de *Fucus vesiculosus*

FSm – Fucoïdan proveniente dos extratos de *Sargassum muticum*

NP – Nanopartículas

PdI – Índice de polidispersão

TA – Temperatura ambiente

TC – Temperatura controlada

# 1. Introdução

## 1.1 Macroalgas marinhas

As macroalgas marinhas são organismos eucariotas macroscópicos, que podem ter dimensões superiores a 30 metros e que realizam fotossíntese ao recorrer aos cloroplastos, organelos que contêm clorofila. Fazem parte dos ecossistemas marinhos das regiões costeiras e têm atualmente diversas aplicações em vários setores. São utilizadas na agricultura e aquicultura, empregando partes da alga, ou até mesmo extratos de algas que têm o benefício de evitar o excesso de sal, metais pesados e areia que as algas em si passam para o solo. As macroalgas são usadas também na produção de fertilizantes, e estes substituem em parte os fertilizantes químicos, o que diminui conseqüentemente os problemas de saúde subjacentes ao uso dos últimos (1,2). Outra utilização comum das macroalgas é na suplementação das dietas dos animais, de modo a melhorar a qualidade da carne e peixe, e a quantidade de minerais destes, ou dos produtos desses mesmos animais, como por exemplo os ovos (3–5).

As macroalgas diferem das microalgas principalmente pelo tamanho, uma vez que as microalgas apresentam tamanhos entre as décimas e as centenas de  $\mu\text{m}$ , mas também por as microalgas serem organismos geralmente unicelulares e com a possibilidade de serem procariotas ou eucariotas. Tal como as macroalgas realizam fotossíntese, também as microalgas o fazem, embora neste último caso seja um processo com rendimento superior, uma vez que são células mais simples e não apresentam tecidos não fotossintéticos. Para além disso, as microalgas movem-se por flagelos e podem ser encontradas em quase todo o mundo, desde em ambientes gélidos até a desertos, com a condição que exista luz e água. A Figura 1.1 é representativa de uma microalga.

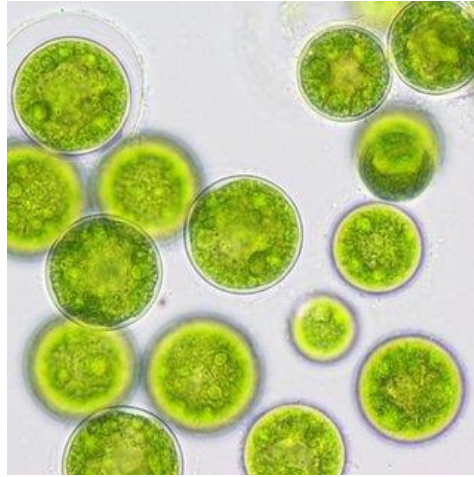


Figura 1.1 - Exemplo de microalga vista ao microscópio, da espécie *Nannochloropsis oculata*. Retirado de (6).

Devido ao facto das macroalgas possuírem um baixo conteúdo de gorduras e alto teor de aminoácidos, proteínas, fibras, uma série de minerais, e várias vitaminas como A, C, E e também vitaminas do complexo B, que normalmente não estão presentes nos vegetais, apresentam interesse do ponto de vista da indústria alimentar para fins de suplementação (1,7). Na composição das macroalgas, encontram-se ainda polímeros que podem ser utilizados como agentes gelificantes, espessantes e estabilizadores por terem na sua composição fitocolóides, tal como os alginatos e a carragenina. Podem igualmente ser usados para a purificação de águas e solos, uma vez que apresentam uma excelente capacidade de sequestrar metais pesados destas (8,9).

Os bioativos das macroalgas também apresentam interesse na indústria cosmética devido a propriedades como antioxidante, viscosificante e aglutinação de água (10). Na literatura encontram-se alguns trabalhos onde os investigadores verificaram um efeito na redução do aparecimento de olheiras e estimulação da produção de colagénio (11). Para além disto, há também a produção de produtos cosméticos como loções corporais, champôs e sabonetes com base em compostos extraídos destas algas (1,10). No caso da indústria farmacêutica, as macroalgas são geralmente utilizadas para a extração de alguns dos seus componentes bioativos que podem ser de interesse devido a apresentarem as mais diversas atividades, desde imunomodulação a atividade antitrombótica e anticoagulante (12–15).

As macroalgas dividem-se em três grandes grupos consoante a sua pigmentação, as clorófitas (algas verdes), as feófitas (algas castanhas) e as rodófitas (algas vermelhas),

com exemplos representativos de cada grupo na Figura 1.2. O pigmento principal das algas verdes é a clorofila, das algas castanhas é a fucoxantina, e das algas vermelhas são a ficoeritrina e a ficocianina. Todas elas encontram aplicações várias, inclusive na área da biomedicina. O presente trabalho foi desenvolvido com base em extratos obtidos de algas castanhas e foi utilizado também um polímero, obtido comercialmente numa forma com algum grau de purificação, o qual é extraído de algas vermelhas. Por essa razão se detalham abaixo as características das espécies de macroalgas castanhas *Sargassum muticum* e *Fucus vesiculosus*, bem como da carragenina, o polissacárido obtido de algas vermelhas, e de outro polímero utilizado, também de origem marinha, o quitosano.



Figura 1.2 - Imagens representativas de algas verde, castanha e vermelha, respetivamente. a) *Ulva lactuca* b) *Saccorhiza polyschides* c) *Plocamium cartilagineum*. Retirado de (16-18).

### 1.1.1 *Sargassum muticum*

A macroalga *Sargassum muticum*, da ordem Fucales, representada na Figura 1.3, é uma alga invasora castanha de origem japonesa, que pode ser encontrada ao longo das costas oeste da Europa e América do Norte, e do Japão. Devido ao seu carácter invasivo, e uma vez que a sua erradicação recorrendo a métodos físicos e químicos não teve sucesso, pode ser promissor encontrar outras aplicações para este tipo de alga de modo a

dar-lhe uma finalidade, parar a sua disseminação, e melhorar o seu valor de mercado (19,20). Esta alga apresenta uma série de atividades biológicas, tais como antibacteriana, antioxidante, anticancerígena, citoprotetora e antiviral, entre outras (21–24).



Figura 1.3 - Alga castanha invasora *Sargassum muticum*. Retirado de (25).

O *Sargassum muticum* contém polímeros como o fucoidan e o alginato, entre outros, e também compostos fenólicos que exibem uma excelente atividade antioxidante por terem a estrutura adequada para a eliminação de radicais livres, doação de eletrões e átomos de hidrogénio, e quelação de catiões metálicos, (26,27).

#### 1.1.2 *Fucus vesiculosus*

Dentro da ordem Fucales, *Fucus vesiculosus*, representada na Figura 1.4, é uma macroalga castanha comestível localizada maioritariamente ao longo das costas do oceano Atlântico, e dos mares Báltico e Nórdico. Esta macroalga tem sido extensivamente estudada com o objetivo de ser utilizada em produtos cosméticos, biofertilizantes, na pecuária como ração animal e na indústria alimentar como aditivo, para além de ser utilizada na indústria farmacêutica (28–33).



Figura 1.4 – Imagem da alga castanha *Fucus vesiculosus*. Retirado de (34).

Embora as quantidades alterem devido a alguns fatores como a época e o habitat, entre outros, a alga *F. vesiculosus* contém na sua constituição alginatos e fucoïdan como principais polímeros, tal como a alga *Sargassum muticum*, e também fucoxantina e laminarina (35,36). *F. vesiculosus* é uma alga que apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana e anticancerígena, entre outras (33,37–41). Para além de ser a espécie que tem a maior quantidade de fucoïdan, que pode chegar até 20% do seu peso seco, tem também presente iodo na sua composição, que lhe confere utilidade em casos de hipotireoidismo (13,42). O fucoïdan presente em *F. vesiculosus* tem na sua estrutura uma predominância de fucose e um baixo grau de acetilação (28).

## 1.2 Polímeros de origem marinha

### 1.2.1 Fucoïdan

O principal polímero das algas castanhas é o fucoïdan, e pode ser encontrado apenas nas paredes celulares destas algas, como *Sargassum muticum* e *Fucus vesiculosus*, onde tem função estrutural (22). É um polissacárido aniônico sulfatado principalmente formado por fucose. No entanto, existem vários tipos de fucoïdan com composição que pode variar consoante, por exemplo, a espécie da alga da qual é extraído o fucoïdan e até a localização geográfica da alga (13,43). Todos os tipos de fucoïdan têm composição complexa e que pode diferir quanto ao tipo de ligação, substituintes presentes, ramificação e grau de sulfatação, conferindo-lhes diferentes características físico-químicas e, conseqüentemente, diferentes propriedades biológicas (13). Outros fatores que

influenciam a estrutura do fucoidan extraído são o método de extração, e a época de colheita (44). Um possível esquema da estrutura do fucoidan encontra-se representado na Figura 1.5, e é constituída maioritariamente por ligações alternadas  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4) de moléculas de L-fucose, e também por grupos sulfato que conferem o carácter aniónico ao fucoidan, sendo a restante composição à base de monossacarídeos como manose, galactose, glucose, xilose, entre outros, e ainda proteínas e grupos acetilo (13,45,46). Trata-se de um polissacárido bastante solúvel em água quando extraído e esta solubilidade está relacionada com o grau de sulfatação do mesmo (47,48).

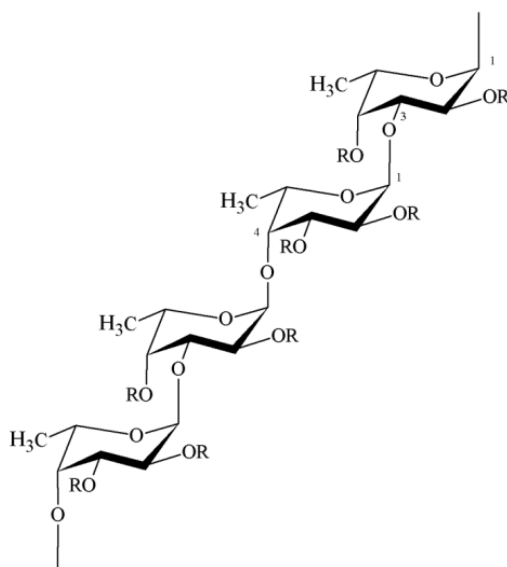
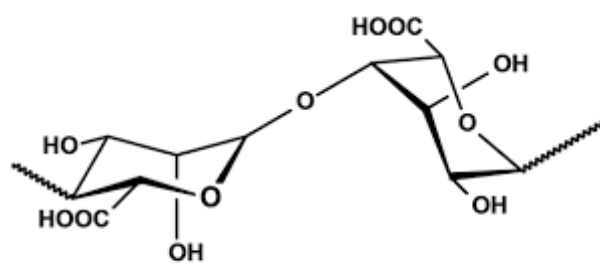


Figura 1.5 - Esquema da possível estrutura do fucoidan, extraído da ordem Fucales, com ligações alternadas  $\alpha$ -(1,3) e  $\alpha$ -(1,4). (R representa o local de potenciais substituintes, como sulfato, manose, galactose, entre outros). Adaptado de (48).

O fucoidan é um polissacárido com utilização bastante reportada em trabalhos de investigação, com o objetivo de desenvolver medicamentos ou nutracêuticos, devido ao facto de apresentar grande potencial terapêutico em virtude da sua atividade antitrombótica, anticoagulante, imunomoduladora, antiviral e antioxidante (13,14,45,49–52). Como é um polímero de origem natural, tem maior probabilidade de apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade e ausência de toxicidade para o organismo humano (48,53). Alguns estudos científicos demonstram a utilização do fucoidan em sistemas de veiculação de fármacos, incluindo nanopartículas, embora não exista no mercado nenhum medicamento que contenha fucoidan na sua composição (47,48,53,54).

### 1.2.2 Alginato

O alginato, presente nas duas espécies de algas em foco, *S. muticum* e *F. vesiculosus*, é um polissacárido aniônico encontrado na matriz celular de algas castanhas, tendo como função conferir-lhes robustez e flexibilidade estrutural, de maneira a que as algas consigam sobreviver no mar (55). O alginato é um polímero composto por duas unidades diferentes conhecidas como ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G), representadas na Figura 1.6. Estas unidades distribuem-se aleatoriamente ao longo de uma cadeia linear para formarem blocos homogêneos, MM e GG, e blocos heterogêneos, MG (56). Esta variabilidade de conformação leva a que haja vários tipos de alginatos, com diferentes propriedades físicas e reológicas. Portanto, as propriedades do alginato variam com a razão M/G e com a distribuição dos blocos ao longo de toda a cadeia linear (57).



ácido  $\beta$ -D-manurónico (M)      ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G)

Figura 1.6 - Representação das duas unidades estruturais que constituem os alginatos, ácido  $\beta$ -D-manurónico (M) e ácido  $\alpha$ -L-gulurónico (G). Retirado de (58).

Como exemplo das referidas diferenças para razões M/G diferentes é que aqueles alginatos que possuem maior quantidade de M apresentam uma maior viscosidade, enquanto aqueles que possuem mais unidades G exibem propriedades de gelificação mais fortes (55,56). O alginato, devido às características descritas anteriormente, é utilizado como um agente gelificante e viscosificante, mas apresenta uma série de atividades para além desse propósito, entre as quais anti-inflamatórias e antitumorais (13). Além disso, como demonstrado num estudo onde ratos foram submetidos a uma dieta rica em gordura, os alginatos impedem o aumento de peso, diminuem o consumo energético, e mitigam a hiperglicemia e hiperlipidemia, o que resulta numa melhoria de situações de obesidade e síndromes relativas a esta condição (59,60).

### 1.2.3 Carragenina

O polímero principal presente nas algas vermelhas, a carragenina, é um polímero sulfatado que pode ser encontrado em várias espécies destas algas (61). A estrutura base do polímero é constituída por cadeias lineares de unidades de D-galactose e 3,6-anidrogalactose ligadas alternadamente por ligações  $\alpha$ -(1-3) e  $\beta$ -(1-4) (48). Embora existam 15 estruturas diferentes de carragenina, destacam-se os três principais tipos de carragenina comercial, que são kappa ( $\kappa$ ), iota ( $\iota$ ) e lambda ( $\lambda$ ), representados na Figura 1.7, onde o grau de sulfatação da carragenina varia de acordo com o tipo de polímero (62). O tipo  $\kappa$  tem um grupo sulfato por dissacárido,  $\iota$  tem dois e  $\lambda$  tem três (13,63). Relativamente às suas propriedades, o poder gelificante diminui diretamente com o aumento do grau de sulfatação da carragenina, sendo a  $\kappa$ -carragenina a mais forte e a  $\lambda$ -carragenina a mais fraca, esta última sendo apenas usada como agente viscosificante (13,61).

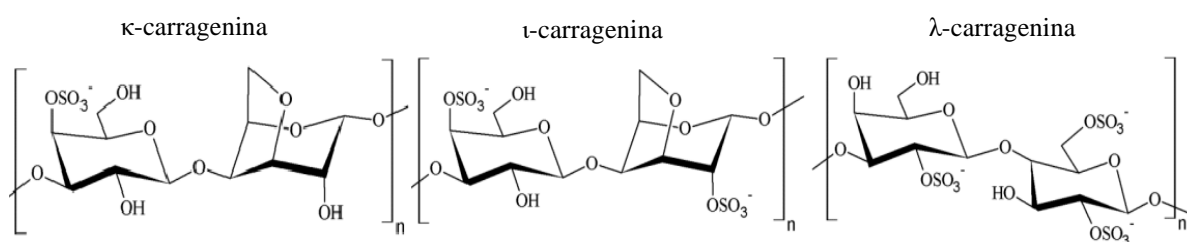


Figura 1.7 – Estrutura dos três principais tipos de carragenina comercial: kappa, iota e lambda. Adaptado de (13).

A carragenina apresenta uma estrutura helicoidal, que lhe permite formar diferentes tipos de géis a temperatura ambiente, podendo ser utilizada como agente gelificante ou espessante na indústria alimentar, tanto humana como animal, e na indústria farmacêutica (64).

Há uma grande diversidade de alimentos onde a carragenina é aplicada, nomeadamente em alimentos enlatados, tanto para consumo humano como animal, em gelados e recheios de bolos, entre outros (13). No caso da indústria, utilizam-se extratos purificados da carragenina com o intuito de clarificar algumas bebidas alcoólicas e também mel (15).

Na indústria farmacêutica as aplicações da carragenina são as mais variadas. Existem hidrogéis termorreversíveis à base de carragenina que permitem a deposição e formação de camadas de hidroxiapatite, um constituinte inorgânico dos ossos humanos, que quando expostos a fatores específicos, favorecem a regeneração óssea (65,66). A carragenina

demonstrou também ser um bom veículo de hidroxiapatite em formulações injetáveis, utilizadas em alternativa a excertos ósseos (67). No caso do tecido cartilaginoso a  $\kappa$ -carragenina apresenta um excelente potencial na engenharia deste tecido, uma vez que mimetiza os glicosaminoglicanos sulfatados que estão presentes na matriz extracelular da cartilagem, propriedade que é atribuída à presença dos grupos sulfato na sua composição (68,69). Outra aplicação dos hidrogéis de carragenina é na cicatrização de feridas, uma vez que se verifica uma melhor cicatrização destas em ambientes húmidos, e verificou-se que hidrogéis de  $\iota$ -carragenina promoviam o recrutamento de células para o local e a sua epitelização (70,71). Para além destas aplicações, está descrita atividade antiviral, antiagregante e anticoagulante para a carragenina (72–76).

#### 1.2.4 Quitosano

O quitosano é um polissacárido derivado da quitina, obtido pela desacetilação deste polímero (77). A quitina por sua vez está presente no exoesqueleto de invertebrados bem como na parede celular de algumas plantas inferiores, onde tem função estrutural, embora seja geralmente obtida das carapaças dos crustáceos como o camarão, sendo portanto de origem marinha (77–79). O quitosano apresenta, assim, um baixo grau de acetilação, sendo composto por cadeias  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetil-D-glucosamina, atribuindo-lhe os grupos amina a possibilidade de dissolução em soluções aquosas ácidas (77). Este polissacárido está representado na Figura 1.8.

Um dos passos da extração do quitosano, a desproteinização química, requer o uso de reagentes que despolimerizam a quitina, resultando em polímeros com pesos moleculares menores (13). Pesos moleculares diferentes resultam em graus de desacetilação também variados, o que, entre outras características, confere propriedades bastante distintas aos quitosanos (79,80). Alguns exemplos são o tio-quitosano que possui grupos tiol que intensificam a mucoadesão, e o O-carboximetil-quitosano que demonstra alta afinidade com o sangue (81,82). No segundo passo da extração, a desmineralização química, é também possível obter sais de quitosano, sendo estes mais puros e solúveis diretamente em água (13). A escolha do quitosano está então dependente da finalidade da sua utilização. Os quitosanos podem ser considerados de baixo peso molecular, tal como o utilizado neste trabalho, ao possuírem pesos moleculares entre os intervalos de aproximadamente 3 e 190 kDa (83).

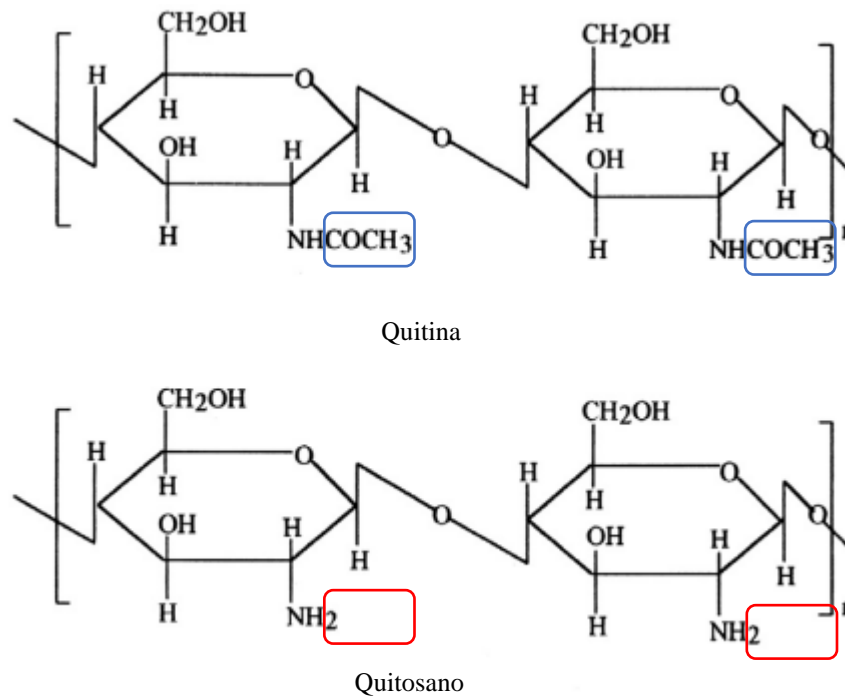


Figura 1.8 – Estrutura da quitina que apresenta grupos acetilo (formas azuis), e do quitosano que não os possui (formas vermelhas). Adaptado de (13).

Este polissacárido está bastante estudado e, portanto, é muito utilizado em várias vertentes. Na área dos nutracêuticos, sabe-se que o quitosano não é metabolizado no trato intestinal superior e é uma fibra dietética, promovendo a não absorção de glúcidos e lípidos, o que contribui para uma aceleração do trânsito intestinal (84). Embora não seja consensual na literatura, o quitosano é um composto com potencial para promover o emagrecimento, estando aprovado como suplemento alimentar no Japão, Itália e Finlândia (80,85,86). De acordo com alguns estudos, pode ainda aumentar a excreção de ácidos gordos aterogénicos (84). Outras aplicações do quitosano consistem no seu uso como agente conservante de alimentos devido à sua atividade antimicrobiana e antifúngica, na sua potencial utilização como agente prebiótico por o quitosano melhorar a microbiota intestinal (79,80,83,84,87). A biodegradação do quitosano é afetada por diversos fatores tais como peso molecular, grau de desacetilação, grau de pureza e teor de humidade (88). Por exemplo, os quitosanos com maior peso molecular têm que sofrer degradação suficiente para a excreção renal ser possível (88). O quitosano é degradado nas mucosas pela ação de uma enzima principal, a lisozima, que cliva as ligações deste (88,89). Quitosano e sais de quitosano demonstraram ser biocompatíveis e não tóxicos (90). Para além disso, é também um material relativamente barato (79).

No que se refere a uma potencial aplicação farmacêutica, o quitosano apresenta uma série de atividades como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antivírica e cicatrizante, e apresenta ainda propriedades mucoadesivas, o que o transforma num candidato muito bem posicionado para o desenvolvimento de algumas terapêuticas (13,83,91–94). As atividades antimicrobiana, antifúngica e antitumoral têm sido associadas a interações proporcionadas pelos grupos amina, carregados positivamente, que permitem interação eletrostática com a superfície da célula carregada negativamente e assim acumulação, quelação de elementos vestigiais e metaloenzimas, rompimento de membranas celulares, e bloqueio da transcrição de ácido ribonucleico (ARN) a partir do ácido dextrorribonucleico (ADN) quando as moléculas de quitosano estão dentro do núcleo da célula (80).

Em suma, tendo em conta todas as aplicações descritas, os polissacáridos extraídos das diversas macroalgas e dos compostos marinhos em geral têm um grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos e para a exploração do potencial das várias vias de administração. Em muitos casos estão envolvidos na produção de sistemas de veiculação de fármacos e de outras moléculas de interesse, como micro e nanopartículas (43,95–98). Nanopartículas à base de fucoïdan e quitosano têm sido reportadas, demonstrando não só algumas das atividades dos próprios polímeros, como também a possibilidade de veicular fármacos (48,99–101).

### 1.3 Métodos de extração para a obtenção de polímeros

Existem vários métodos de extração de polissacáridos, sendo os mais conhecidos: 1) a extração com água quente, que é o método mais utilizado e segue o princípio de que os polissacáridos são mais solúveis em água quente do que em água à temperatura ambiente; 2) a extração com uma solução alcalina diluída, utilizada para extração de polissacáridos com carácter ácido e/ou maior peso molecular; 3) a extração enzimática, onde há a adição de uma variedade de enzimas, embora seja normalmente utilizada com recurso também à extração com água quente uma vez que permite um melhor rendimento. Existem ainda outros métodos de extração que geralmente recorrem a solventes orgânicos

e, que para além de apresentarem alto custo e baixo rendimento, são prejudiciais para o ambiente (102).

Tendo em consideração a existência e a dependência da indústria relativamente aos métodos de extração que empregam solventes orgânicos, é necessário criar métodos inovadores que sejam mais sustentáveis do ponto de vista ambiental, uma vez que é nesses princípios que a indústria se deve focar (103). Entre as tecnologias de extração sustentáveis existentes, onde se usa apenas água como solvente, descrevem-se métodos que usam microondas, ultrassons, água subcrítica ou autohidrólise, e a possibilidade de extração combinada, que utiliza dois desses métodos de extração com o objetivo de melhorar a extração em pelo menos um dos seguintes pontos: rendimento, tempo, custo, impacto ambiental e segurança (104–107). Para os extratos de *S. muticum* utilizados neste trabalho foi desenvolvido um método de extração sustentável (também denominado amigo do ambiente), representado na Figura 1.9.

Combinam-se dois dos métodos mencionados anteriormente, água quente e aplicação de ultrassons, os quais tinham demonstrado, em trabalhos prévios do grupo de investigação onde foram otimizadas as condições de extração, rendimentos de extração superiores aos obtidos pelos métodos convencionais, como a destilação e a maceração (105,108). Sucintamente, e como mostrado na Figura 1.9, nesta metodologia que foi empregue, os extratos de *S. muticum* foram extraídos recorrendo à extração com água quente, onde foram utilizadas três temperaturas diferentes (40, 60 e 80 °C), juntamente com a aplicação de ultrassons, também com três tempos de extração diferentes (20, 40, 60 min). Seguiu-se uma primeira filtração, após a qual foi adicionado CaCl<sub>2</sub> 1% à fase líquida resultante, de modo a precipitar os alginatos. A segunda filtração retirou os precipitados de alginato, e a fase líquida livre de alginatos foi liofilizada para posterior formulação de nanopartículas.

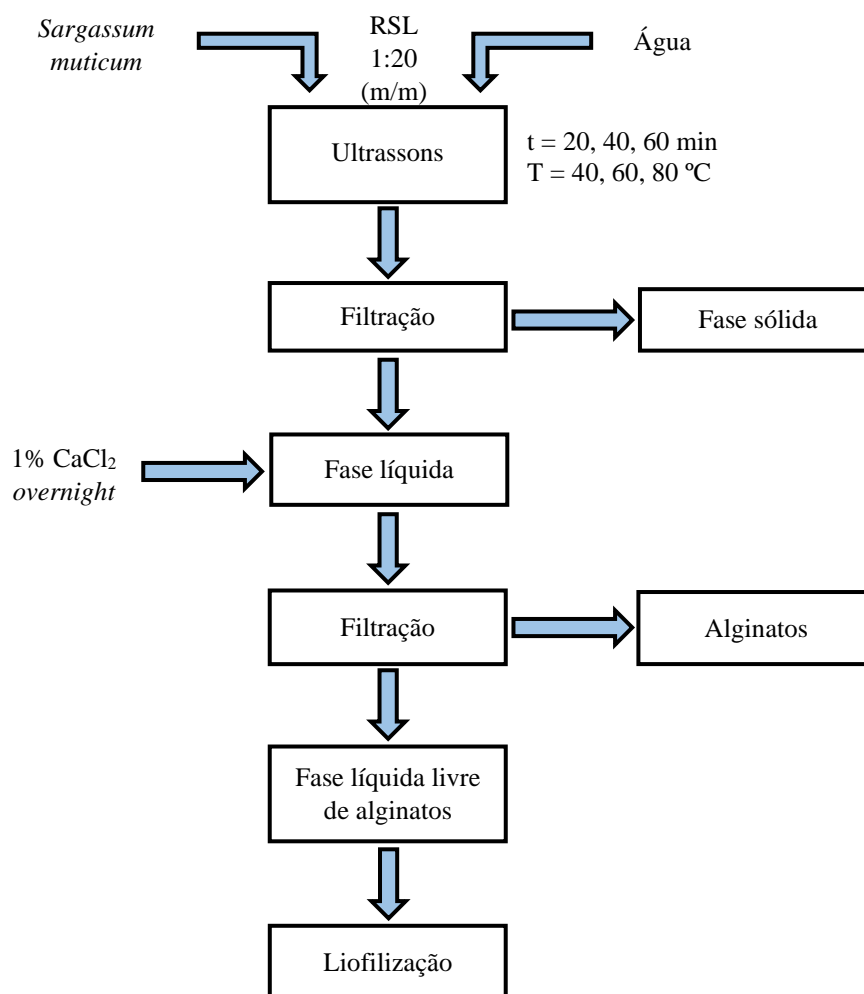


Figura 1.9 - Esquema do método de extração utilizado nos extratos de *Sargassum muticum*. (RSL – rácio sólido líquido).

#### 1.4 Nanopartículas

Um tópico que tem vindo a ser estudado e aprofundado ao longo dos anos na área da saúde, é a utilização de nanopartículas como uma forma de veiculação de vários componentes, desde fármacos de baixo peso molecular, a proteínas e ácidos nucleicos, incluindo ainda agentes de contraste (109–113). A administração das nanopartículas pelas mais variadas vias, como a pulmonar, nasal e ocular, pode constituir uma via alternativa à via de administração mais invasiva, a injetável (114). Existem diversas classes de nanopartículas (Figura 1.10), tais como nanopartículas lipossomais, nanopartículas à base de emulsões, nanopartículas cerâmicas, nanopartículas metálicas, nanopartículas à base de carbono, nanopartículas semicondutoras e, a classe de nanopartículas abordada neste trabalho, nanopartículas poliméricas. Todas estas classes apresentam características e

propriedades diferentes (115). Dada a sua relevância para o trabalho, as nanopartículas poliméricas serão abordadas com maior detalhe na próxima subsecção.

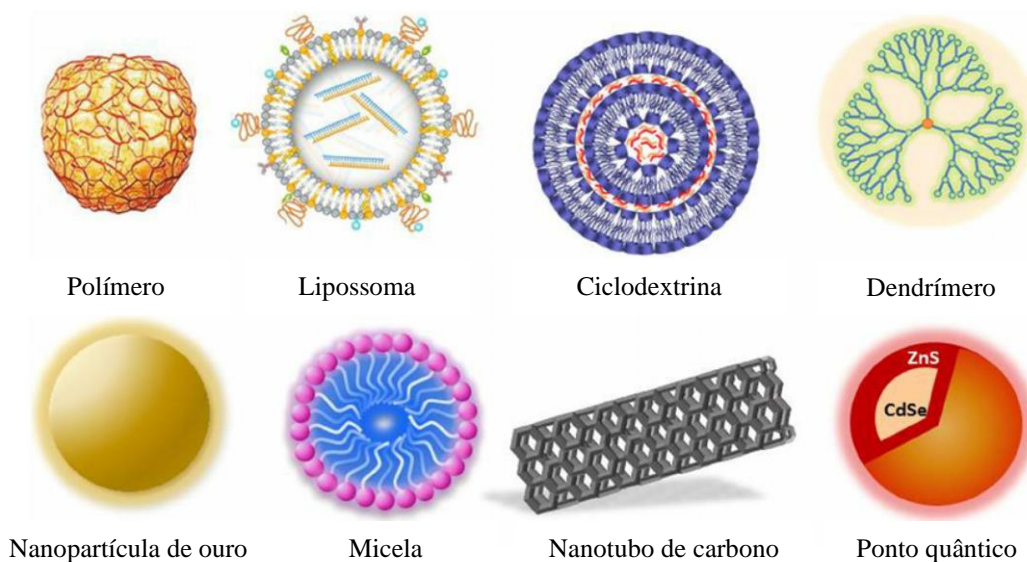


Figura 1.10 - Representação de algumas das classes de nanopartículas existentes. Adaptado de (116).

#### 1.4.1 Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são nanopartículas que apresentam uma matriz constituída por um polímero, sendo que este corresponde à repetição de unidades singulares, denominadas monómeros (117). Este polímero pode ser de origem natural ou de origem sintética. Os de origem natural podem extrair-se de animais, plantas e algas, apresentando vantagens relacionadas com potencial de biocompatibilidade, toxicidade reduzida ou inexistente, e preço relativamente baixo (95,118,119). Têm algumas desvantagens, relacionadas maioritariamente com o facto de serem de origem biológica e apresentarem alguma variabilidade na sua constituição, o que leva a características físico-químicas diferentes e, assim, a comportamentos também distintos aquando da sua utilização, por exemplo na formação de nanopartículas, em propriedades como o tamanho de partícula (117). Alguns exemplos de polímeros naturais e também dos mais utilizados em aplicações biomédicas são o quitosano, o ácido hialurónico, e a celulose (117). Já os polímeros sintéticos, tal como o nome indica, são moléculas obtidas através de síntese química, sendo as suas maiores vantagens o vasto conjunto de monómeros existentes possíveis de se conjugar, que resulta numa elevada variedade de polímeros sintetizados. Ao contrário dos polímeros naturais, estes apresentam uma baixa variabilidade nas suas

propriedades físico-químicas, o que se traduz num comportamento relativamente constante e mais previsível, o que é mais favorável para uma aplicação farmacêutica (117). Os polímeros sintéticos podem ainda ser desenhados de modo a possuírem características e comportamentos específicos, com o intuito de, por exemplo, modelar a libertação de fármacos, ou até apresentar semelhanças a tecidos biológicos e, assim, agirem como biomiméticos (120,121). Por outro lado, também ao contrário dos polímeros naturais, a grande desvantagem deste tipo de polímeros recai na maior dificuldade em garantir a biocompatibilidade e ausência de toxicidade, o que leva a uma utilização reduzida para a produção de nanopartículas, que na maioria dos casos corresponde a poliésteres (117).

Existem diferentes morfologias de nanopartículas poliméricas, sendo que a literatura refere com mais frequência nanocápsulas, nanoesferas, políplexos, polimersomas e dendrímeros, cujas estruturas se encontram representadas na Figura 1.11 (122–124). As nanocápsulas apresentam uma morfologia semelhante a vesículas e incorporam o fármaco no seu núcleo, que pode ser hidrofílico ou hidrofóbico, estando revestido pela cápsula polimérica. Ao contrário das nanocápsulas, as nanoesferas são constituídas por uma matriz polimérica contínua que incorpora o fármaco através de encapsulação, ligações covalentes, e/ou o fármaco pode ser adsorvido à superfícies das nanoesferas. Os polimersomas têm uma estrutura vesicular constituída por dois polímeros distintos ligados covalentemente, formando unidades anfifílicas. Por seu lado, os dendrímeros são polímeros formados pela repetição de estruturas de relativamente larga escala, que se ramificam de forma controlada em estruturas reprodutíveis (117). Finalmente, os políplexos são constituídos por duas moléculas com cargas opostas, um polícatião e um polianião, que pode ser um oligonucleótido ou plasmídeo (125,126).

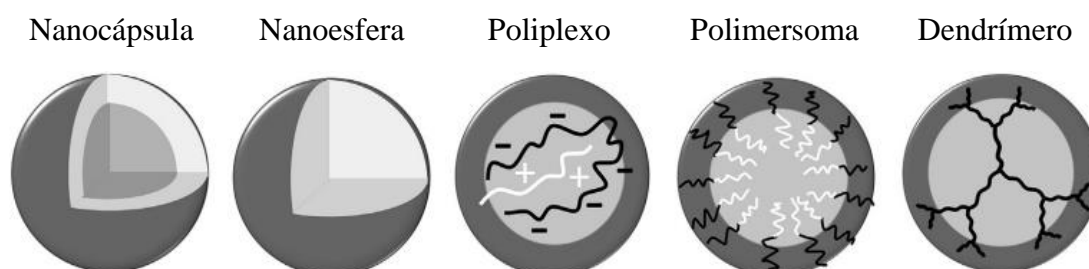


Figura 1.11 - Representação de alguns dos sistemas nanoparticulados mais citadas na literatura. Adaptado de (117).

As nanopartículas formuladas neste trabalho foram produzidas através do método de complexação polieletrólítica, pelo que devido à sua importância, será mais detalhado na secção seguinte.

#### 1.4.2 Complexação polieletrólítica

De entre os vários métodos descritos para formação de nanopartículas, o método de complexação polieletrólítica é um dos mais populares e foi o selecionado para o presente trabalho. A formação de nanopartículas por este método decorre da mistura de dois polímeros de cargas opostas, em meio aquoso, à temperatura ambiente e sob agitação ligeira, o que permite uma interação eletrostática (127). De notar que não é o mesmo que gelificação iónica, outro método utilizado para produção de nanopartículas, sendo a principal diferença entre estes o tamanho das moléculas de aniões utilizados (128). A complexação polieletrólítica requer moléculas de maiores dimensões, polieletrólitos, tais como polímeros, enquanto a gelificação iónica utiliza aniões de tamanhos mais reduzidos como, por exemplo, o fosfato (128,129). Complexos polieletrólíticos de quitosano como catião têm sido bastante estudados e as suas aplicações na área farmacêutica podem ir desde o transporte direcionado de anticorpos, à libertação prolongada de moléculas, incluindo antibióticos e anti-inflamatórios, podendo a sua aplicação estender-se a várias vias de administração (130,131). A literatura descreve que, na produção de nanopartículas utilizando o método de complexação polieletrólítica, o tamanho destas depende de alguns fatores, como a concentração dos polímeros presentes em solução, as características dos polímeros e o volume final utilizado, entre outros (98,132–134).

#### 1.4.3 Caracterização das nanopartículas

As nanopartículas são utilizadas na indústria farmacêutica devido às características que exibem, as quais favorecem e muitas vezes potenciam a interação com os alvos terapêuticos. Algumas dessas características consistem no seu pequeno tamanho, que maximiza a capacidade de interação com as células, o elevado rácio superfície-volume que apresentam e que proporciona a capacidade de veicular fármacos e outras macromoléculas, seja encapsuladas nas nanopartículas ou adsorvidas à sua superfície, e a possibilidade de libertação controlada (109,135–138). Para além destas características, há ainda uma particularidade que os sistemas coloidais demonstram denominada de efeito

Tyndall, representado na Figura 1.12, que consiste na dispersão da luz quando esta incide sobre sistemas desta dimensão (139). Quanto maior a dispersão de luz, mais intenso o efeito Tyndall e maior a quantidade de partículas presentes no meio.

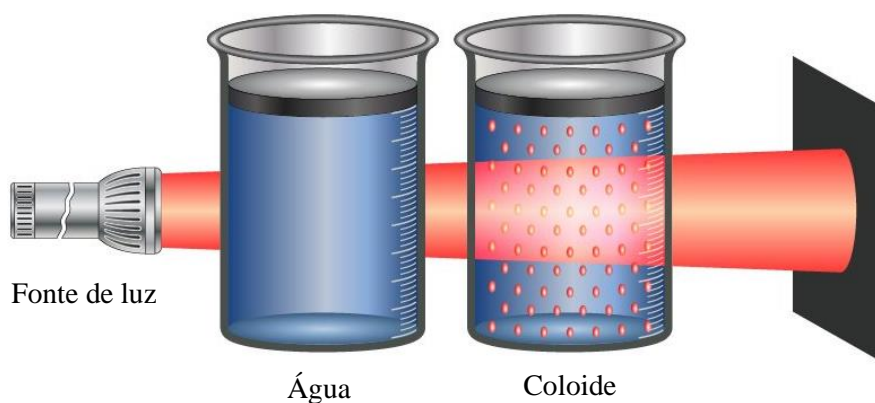


Figura 1.12 - Esquema do efeito Tyndall. Adaptado de (140).

A caracterização das nanopartículas geralmente consiste na determinação do seu tamanho, índice de polidispersão (PdI), carga, forma, propriedades de inchamento, aglomeração, entre outros (141,142). Neste trabalho as nanopartículas serão classificadas quanto às três primeiras propriedades.

A determinação do tamanho das nanopartículas é o critério mais básico e, embora a literatura não seja consensual, estas têm, por definição e de acordo com a Food and Drug Administration tamanhos compreendidos entre 1 e 1000 nm, sendo também dos critérios mais cruciais uma vez que é um parâmetro determinante da sua aplicação (135,143,144). Por exemplo, está demonstrado que o intervalo ideal para haver interação entre nanopartículas e membranas epiteliais se encontra entre 50-500 nm, e também se acredita que, no que toca ao cancro, o tamanho ideal para que haja a passagem das nanopartículas pelos espaços intercelulares das células tumorais, conhecidos como fenestrações e maiores do que aqueles das células saudáveis, e consequente internalização, deve encontrar-se entre 10-200 nm (145–147). O tamanho determina também outras propriedades como, por exemplo, o tempo de circulação das nanopartículas no organismo, a sua velocidade de excreção, e o perfil de libertação do fármaco, entre outros. Por exemplo, no que se refere à possibilidade de fagocitose das nanopartículas, esta é maior para partículas de maior tamanho, estando descrita uma maximização do efeito para cerca dos 1000 nm. Assim, se for pretendida uma terapêutica que exija uma acumulação do

fármaco no fígado, onde existem as células de Kupffer que funcionam como células fagocitárias e principal mecanismo de *clearance* deste órgão, são necessárias nanopartículas de tamanho mais elevado (148–150). A mesma situação acontece no baço (149). Ao contrário dos dois órgãos previamente mencionados, para que haja qualquer excreção a nível renal é necessário que o tamanho das nanopartículas seja inferior a 6 nm (151,152). No que toca ao perfil de libertação do fármaco, é observado um aumento da libertação quando as nanopartículas têm um tamanho mais reduzido, provavelmente devido a apresentarem proporcionalmente uma maior superfície exposta e haver, por isso, maior exposição ao líquido que mediará a dissolução, o que se traduz numa maior libertação do fármaco (153).

A determinação do diâmetro médio de partículas deve vir sempre acompanhada de uma medida da distribuição de tamanho para permitir uma adequada interpretação dos dados. Assim, no caso das nanopartículas é sempre reportado o PdI, que é utilizado como indicador da homogeneidade da população, com valores que variam entre 0 e 1, em que 0 equivale a uma grande homogeneidade da população e o 1 a uma grande heterogeneidade (141). São desejáveis valores de PdI o menores possível para não comprometer a aplicação das nanopartículas.

O potencial zeta é um parâmetro que determina a carga superficial das partículas na superfície de deslizamento (154,155). Alguns elementos podem influenciar o potencial zeta, tais como a concentração, a força iónica, e talvez o mais importante, o pH (155,156). Embora não seja o único fator que contribui, o potencial zeta é um parâmetro de grande relevo porque é um indicador da potencial estabilidade do sistema, que pode ser garantida pela repulsão eletrostática assegurada pelas cargas superficiais, contrariando assim os comportamentos de floculação e agregação (157). A estabilidade da formulação tem uma relação proporcional ao valor do potencial zeta, independentemente de ser positivo ou negativo. Dispersões de nanopartículas com valores de potencial zeta de  $\pm 0-5$  mV,  $\pm 10-30$  mV,  $\pm 30-40$  mV,  $\pm 40-60$  mV e maiores que  $\pm 60$  mV apresentam comportamentos de floculação ou agregação, estabilidade fraca, estabilidade moderada, boa estabilidade e estabilidade excelente, respetivamente (141).

A estabilidade das nanopartículas traduz-se na capacidade de estas manterem as características físico-químicas referidas anteriormente durante um determinado período de tempo. As condições que podem interferir com estas propriedades englobam a temperatura, a luz, a humidade, polaridade e pH, entre outros (141).

## 2. Objetivos

Os objetivos principais deste trabalho foram os seguintes:

- Estudo da capacidade de formular nanopartículas poliméricas a partir de diferentes extratos da alga castanha invasora *Sargassum muticum*, recorrendo ao método de complexação polieletrólítica e usando o quitosano como contra-íão. Para avaliar esta capacidade as nanopartículas produzidas foram caracterizadas quanto ao tamanho, PDI e potencial zeta.
- Avaliação da influência da temperatura de reação durante a formação de nanopartículas compostas quer por fucoïdan da alga castanha *Fucus vesiculosus* e quitosano, quer por carragenina e quitosano, por caracterização dos parâmetros físico-químicos (tamanho, PDI e potencial zeta).

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Reagentes

Foram utilizados para a execução o trabalho nove extratos da alga *Sargassum muticum*, cujas condições de obtenção se encontram detalhadas na Tabela 3.1. Estes extratos foram gentilmente fornecidos pelo Grupo de Investigación Biomasa y Desarrollo Sostenible da Universidade de Vigo (Espanha). Foram extraídos os alginatos existentes nestes extratos por precipitação com CaCl<sub>2</sub> 1% (Sigma, Espanha), o que permitiu obter extratos de *S. muticum* livres de alginato. Por outro lado, o fucoidan proveniente de *Fucus vesiculosus*, com peso molecular de 22993 Da, foi adquirido aos laboratórios Sigma-Aldrich® (Alemanha). A κ-carragenina foi adquirida aos laboratórios FMC Biopolymer (Noruega). O quitosano (CS) utilizado possui um grau de desacetilação 91,7% e peso molecular ~116 kDa foi adquirido aos laboratórios Sigma-Aldrich® (Alemanha) (98). Foi também utilizada água purificada (Milipore®, Portugal).

Tabela 3.1 - Condições de temperatura e tempo de aplicação de ultrassons para o processo de obtenção dos nove extratos de *Sargassum muticum*.

Extrato	Condições de extração	
	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	40	20
2		40
3		60
4	60	20
5		40
6		60
7	80	20
8		40
9		60

#### 3.2 Produção das nanopartículas

Para a preparação das nanopartículas (NP), foram adicionados 0,8 mL de uma solução de polímero a uma concentração pré-determinada, sobre 2 mL de uma solução do polímero (ou extrato do polímero) de carga oposta, à concentração de 1 mg/mL. A metodologia adotada para a descrição das nanopartículas neste trabalho, tendo como um exemplo as NP FSm/CS, significa que o primeiro polímero descrito, que se utiliza sempre na concentração de 1 mg/mL, neste caso o FSm, se encontra na base e é o segundo

polímero, com concentrações variáveis, o CS no exemplo mencionado, que é adicionado sobre o FSm. A mistura ocorreu sob agitação suave, que foi mantida durante 10 minutos, formando-se as nanopartículas espontaneamente por interação eletrostática. O método encontra-se esquematizado na Figura 3.1.

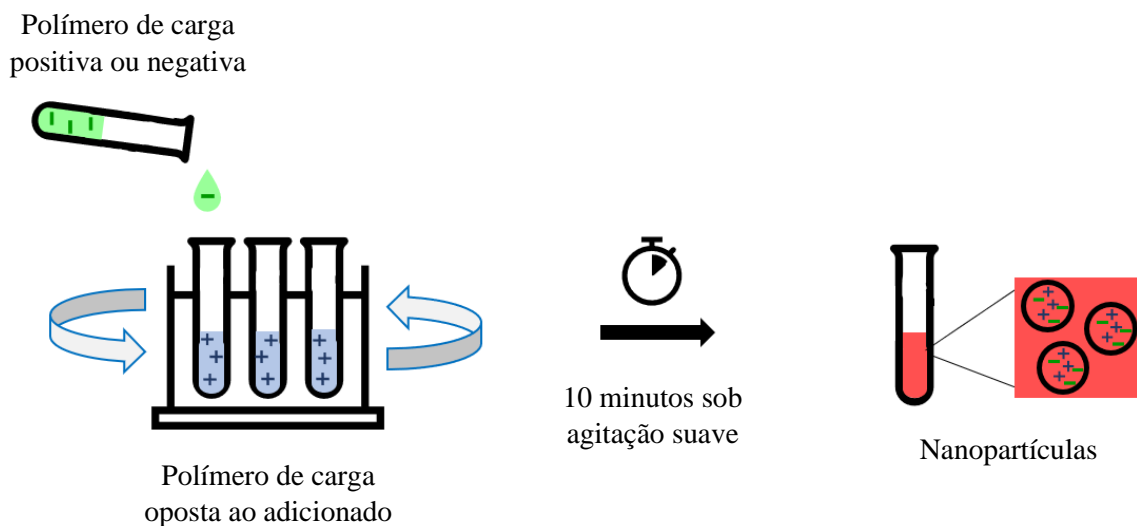


Figura 3.1 - Esquema da produção de nanopartículas poliméricas utilizando o método de complexação polieletrólítica.

### 3.2.1 Nanopartículas produzidas com extratos de *Sargassum muticum*

Os extratos liofilizados de *S. muticum* contendo fucoidan (FSm) foram pulverizados, reconstituídos em água purificada a uma concentração de 1 mg/mL e filtrados, recorrendo a filtros de seringa com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Em paralelo, o CS foi dissolvido em ácido acético 1% (v/v) de modo a alcançar uma concentração de 10 mg/mL, tendo sido filtrado a vácuo de seguida.

A solução *stock* de CS foi posteriormente diluída para alcançar concentrações entre 0,625 e 10 mg/mL, as quais permitiram obter três rácios (m/m) de FSm/CS: 4/1; 1/1 e 1/4. Conforme indicado no início desta secção, as nanopartículas FSm/CS são produzidas com a adição de CS sobre FSm a 1 mg/mL. NP CS/FSm nos mesmos rácios não foram produzidas uma vez que estas formulações exigiam uma maior massa de extratos, o que não era possível de obter.

### 3.2.2 Nanopartículas produzidas com fucoidan de *Fucus vesiculosus*

O fucoidan de *F. vesiculosus* (FFv), obtido comercialmente, foi dissolvido em água purificada de forma a obter concentrações de 10 mg/mL e 1 mg/mL, tendo sido posteriormente filtrado com recurso a filtros de seringa com poros de 0,45 µm de diâmetro. Em paralelo, o CS foi dissolvido em ácido acético 1% (v/v) de forma a obter também concentrações de 10 mg/mL e 1 mg/mL, tendo sido igualmente filtrado a vácuo. Em seguida, foram realizadas diluições das soluções *stock* de 10 mg/mL de CS e FFv para concentrações pré-determinadas até aos 0,625 mg/mL, de modo a permitir a produção de nanopartículas com rácios (m/m) 4/1, 1/1 e 1/4, tanto de FFv/CS, como CS/FFv. As nanopartículas FFv/CS são produzidas com adição de CS sobre FFv a 1 mg/mL, enquanto as CS/FFv são produzidas com a adição de FFv sobre CS a 1 mg/mL. A produção das nanopartículas foi testada geralmente a temperatura ambiente, mas também se realizaram alguns ensaios a temperatura controlada (15 °C) para testar o efeito da temperatura do meio de reação nas características das nanopartículas. Para esse estudo em particular foram selecionadas duas formulações, CS/FFv = 1/1 e FFv/CS = 4/1 e a temperatura de reação foi controlada por utilização de um banho, recorrendo à utilização de gelo para alcançar a temperatura.

### 3.2.3 Nanopartículas produzidas com carragenina

No caso da carragenina (CRG), esta foi dissolvida em água purificada à temperatura de 60 °C e filtrada a vácuo, de modo a obter uma solução *stock* de concentração 1 mg/mL. Em seguida, com a diluição da solução *stock* para concentrações pré-determinadas entre 0,5 e 0,833 mg/mL e ao utilizar uma solução de 1 mg/mL de CS, foram obtidos os rácios de massa de CS/CRG = 5/1, 4/1 e 3/1. As nanopartículas CS/CRG são produzidas com a adição de uma solução de CRG sobre uma solução de CS à concentração de 1 mg/mL. Para o estudo do efeito da temperatura do meio de reação foram selecionados os rácios de massa CS/CRG = 4/1 e 3/1.

## 3.3 Caracterização das nanopartículas

Após a produção das nanopartículas foi determinado o tamanho, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta destas através de espectroscopia de correlação fotónica e anemometria de laser Doppler, recorrendo-se a um equipamento específico para o efeito

(Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). As amostras para estas leituras consistiram em 40  $\mu\text{L}$  da dispersão de nanopartículas produzida, diluídos em 1 mL de água purificada. As distintas formulações de nanopartículas produzidas foram testadas no mínimo em triplicado.

### 3.4 Análise estatística

A análise estatística dos resultados da caracterização das nanopartículas foi feita pela realização do teste t e de ANOVA de uma via, com utilização do teste Tukey no último caso, utilizando o programa GraphPad Prism 9. Foram consideradas diferenças significativas sempre que  $p < 0,05$ .

## 4. Resultados e discussão

### 4.1 Caracterização das nanopartículas produzidas com extratos de *Sargassum muticum*

Os dados obtidos para o parâmetro do tamanho das nanopartículas poliméricas FSm/CS estão representados na Figura 4.1. Verificou-se, de um modo geral nestas partículas, a tendência de o efeito Tyndall diminuir consoante se diminuíram os rácios de massa, desde FSm/CS = 4/1 para 1/4, no último não se tendo observado efeito Tyndall nas nanopartículas de nenhum extrato. Também se verificou uma tendência de acordo com as condições de extração dos extratos, onde se constatou uma diminuição do efeito Tyndall desde o extrato 9 para o extrato 1. A presença de maior efeito Tyndall indicia um maior rendimento de produção. Com isto presente, considerou-se que os extratos 4 até 9 demonstraram mais rendimento.

Como se observa, há um comportamento similar entre os resultados obtidos para todos os rácios, em que o tamanho regista um aumento quase linear em cada um dos rácios de massa testados quando se variam os extratos utilizados. Neste contexto, genericamente o extrato 1 apresenta o menor tamanho e o extrato 9 o maior. Considerando as condições de extração dos extratos, verifica-se um aumento progressivo do tamanho desde as nanopartículas produzidas com os extratos obtidos a menor temperatura e tempo de extração para aqueles obtidos a maior temperatura e tempo de extração ( $p < 0,05$ ). De modo a conseguir interpretar corretamente o que influencia este comportamento seria necessário ter dados da caracterização composicional dos extratos, o que infelizmente não foi ainda possível. No entanto, num estudo onde foram produzidas nanopartículas de fucoidan/quitosano com extratos de fucoidan da alga castanha *Laminaria ochroleuca* obtidos a várias temperaturas (70 a 100 °C) e com um método de extração similar, ainda que não tenha envolvido a aplicação de ultrassons, registaram-se em alguns casos aumentos de tamanho de nanopartículas que foram atribuídos a uma maior quantidade de fucose disponível para interagir com o CS presente nos extratos obtidos às temperaturas mais altas (43).

No trabalho presente, uma única exceção à tendência descrita acima foi observada para o extrato 7 nas NP FSm/CS = 4/1, em que o tamanho se reduz, ao contrário do esperável. Para além disso, verificou-se que as NP FSm/CS = 4/1 resultantes dos extratos 5, 6, 8 e 9, os quais tinham sido sujeitos a condições de extração mais extremas,

precipitaram. Este comportamento pode ter resultado da maior disponibilidade das cadeias de fucose disponíveis para reagir com o CS mencionada anteriormente. Este fator combinado com a maior presença de fucoïdan em solução resultante do rácio da formulação (FSm/CS = 4/1), poderá originar agregados de moléculas de fucoïdan ligadas a um reduzido número de moléculas de CS, impedindo a formação adequada das nanop rticulas e precipitando. Observa-se ainda que para as NP FSm/CS = 4/1 o tamanho varia entre 277 e 432 nm, valores não muito díspares entre si e, embora inferiores, não muito diferentes dos obtidos para FSm/CS = 1/1 (333-499 nm). Contrariamente, as NP FSm/CS = 1/4 apresentaram tamanhos muito superiores ( $p < 0,05$ ), variando entre 602 nm e 1042 nm, o que representa um aumento de cerca de 70% do tamanho.

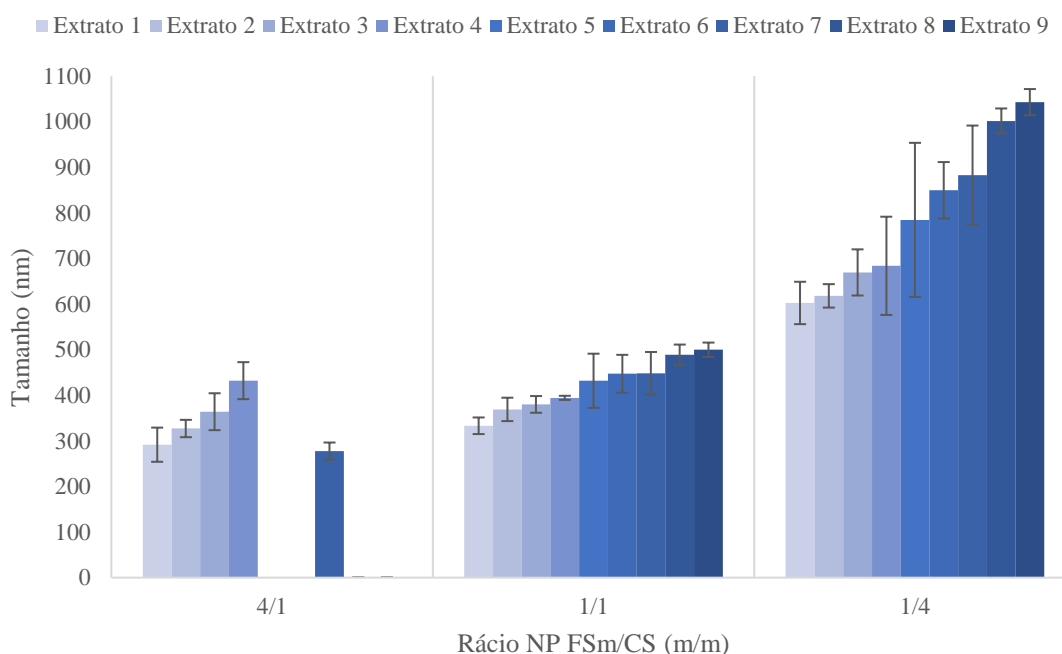


Figura 4.1 - Tamanho das nanop rticulas formuladas a partir dos diferentes extratos de *Sargassum muticum* e quitosano, com diferentes rácios de massa FSm/CS: 4/1; 1/1; 1/4. Dados representam média  $\pm$  desvio padrão;  $n \geq 3$ .

De facto, quando para cada extrato se comparam os tamanhos entre os vários rácios de massa testados (4/1 para 1/1 para 1/4), verifica-se que genericamente não há diferenç s de 4/1 para 1/1, mas estas tornam-se significativas para 1/4 ( $p < 0,05$ ). A produção destas nanop rticulas tem lugar mantendo constante a quantidade de FSm em solução, sobre a qual se adicionam soluções de diferente concentração de CS para cumprir os rácios estipulados. Assim, os resultados indicam a existência de um claro efeito de dependência

da concentração de polímeros catiónico e aniónico, e um maior impacto do CS em comparação com o FSm, sendo que a partir de uma determinada concentração de CS (FSm/CS = 1/4) dar-se-á um maior número de ligações das moléculas de CS ao FSm. Devido à diferença de massas existente em solução e, derivado do peso molecular do CS, o resultado corresponde a nanopartículas de maiores dimensões. O mesmo comportamento de aumento do tamanho das nanopartículas de fucoïdan/quitosano ao aumentar a concentração de CS foi observado em estudos prévios (43).

Tendo em conta as condições de extração dos extratos e as observações do tamanho das NP obtidas, pode deduzir-se que tanto a temperatura de extração como o tempo de extração têm influência no tamanho das NP resultantes da utilização destes extratos. A observação geral é que, quanto maior a temperatura de extração e o tempo de extração, maior o tamanho das NP.

A par com a determinação do tamanho das nanopartículas, importa perceber como é a distribuição de tamanhos, que vem dada pelo parâmetro correspondente ao índice de polidispersão (PdI), representado na Figura 4.2. De um modo geral observam-se valores de PdI abaixo de 0.3 apenas nas NP FSm/CS = 4/1, ou seja, quando a quantidade de FSm prevalece sobre CS e as NP têm menor tamanho, como descrito acima. Este valor indica uma polidispersão relativamente baixa e é considerado satisfatório (158). O aumento da polidispersão é observado de forma mais evidente nas NP FSm/CS = 1/4 ( $p < 0,05$ ), atingindo valores superiores a 0.5 em alguns casos, o que já é indicador de polidispersão considerável, que não é desejável para aplicações farmacêuticas ou biomédicas. Esta observação acompanha de certo modo o que foi verificado para o tamanho das NP e descrito acima, em que a inclusão na matriz de uma maior quantidade de CS conduz a partículas maiores e também mais polidispersas. Quando as comparações são estabelecidas dentro dos mesmos rácios, verificando o efeito da utilização dos diferentes extratos, observa-se que o aumento da temperatura de extração juntamente com o aumento do tempo de extração, resultam, de modo geral, num aumento do PdI das NP, traduzindo uma maior polidispersão ( $p < 0,05$ ). No entanto não se verificou isto dentro do rácio 4/1, uma vez que as diferenças obtidas não são estatisticamente significativas.

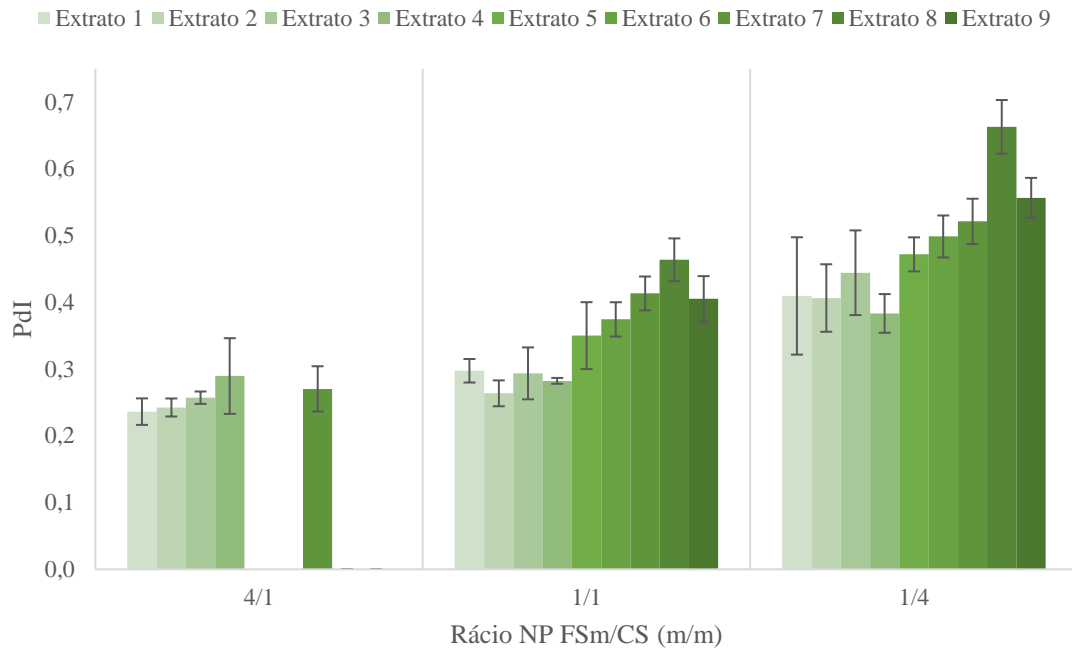


Figura 4.2 - PdI das NP formuladas a partir dos diferentes extratos de *Sargassum muticum* e quitosano, com diferentes rácios de massa FSm/CS: 4/1; 1/1; 1/4. Dados representam média  $\pm$  desvio padrão;  $n \geq 3$ .

O potencial zeta é outro parâmetro tipicamente caracterizado no que se refere às propriedades físico-químicas dos sistemas nanoparticulados, uma vez que reflete a sua carga superficial, que será responsável por muitos dos comportamentos de interação dos sistemas, além de que tem um papel preponderante na sua estabilidade. A Figura 4.3 mostra os resultados obtidos para as NP formuladas. A primeira observação que merece um comentário é o facto de que, independentemente da composição das NP, o potencial zeta é sempre positivo. De facto, mesmo quando o FSm predomina na composição (FSm/CS = 4/1), o potencial varia entre +30 e +40 mV, o que é consequência da elevada densidade de carga por unidade de massa do CS, comparativamente ao fucoídano. A superioridade de densidade de carga do CS já tinha sido documentada anteriormente (43). Nas NP FSm/CS = 1/1 sobe para +52 - +57 mV, chegando a valores de +67 mV nas NP FSm/CS = 1/4. Verifica-se assim um aumento do potencial zeta com o aumento da quantidade de CS presente nas NP ( $p < 0,05$ ), o que era esperado dada a carga positiva que é atribuída pelo CS, em virtude da presença dos grupos amina. Como mencionado, o potencial zeta tem um papel importante na estabilidade dos sistemas coloidais, pelo que considerando a existência de valores acima de +30 mV, se estima que as nanopartículas

apresentem boa estabilidade em todos os casos, assegurada pela repulsão eletrostática (141).

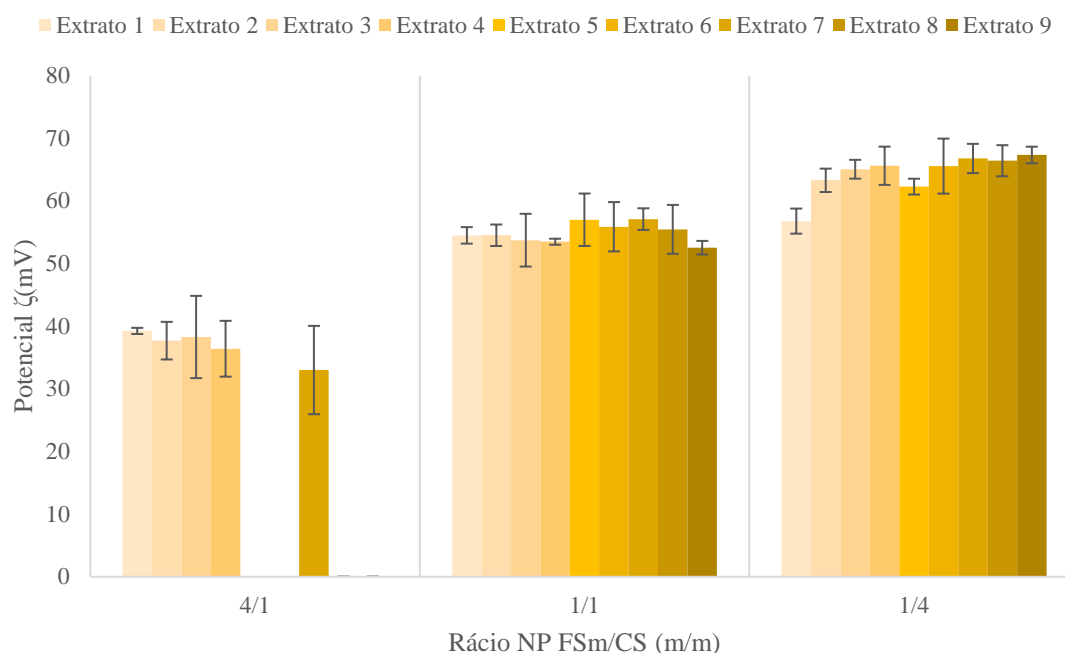


Figura 4.3 - Potencial zeta das NP formuladas a partir dos diferentes extratos de *Sargassum muticum* e quitosano, com diferentes rácios de massa FSm/CS: 4/1; 1/1; 1/4. Dados representam média  $\pm$  desvio padrão;  $n \geq 3$ .

#### 4.2 Caracterização das nanopartículas produzidas com fucoidan de *Fucus vesiculosus*

A preparação de nanopartículas de quitosano/fucoidan foi inicialmente reportada utilizando o polímero obtido de *Fucus vesiculosus*, usando-se igualmente a metodologia de complexação polieletrólítica utilizada no presente trabalho (159). Uma vez que a temperatura é um fator que pode influenciar as características das nanopartículas e que regularmente se verificam alterações destas características nas NP reproduzidas na época do verão, não obstante a constante climatização ativa do laboratório, foram produzidas NP quitosano/fucoidan com o propósito de testar essa hipótese, utilizando fucoidan proveniente da alga *F. vesiculosus*. Para isso, as NP foram preparadas quer à temperatura ambiente (TA), que resulta ser de aproximadamente 25 °C, quer a uma temperatura controlada (TC) (15 °C), de modo a comparar os parâmetros de caracterização (tamanho, PdI e potencial zeta) e verificar o impacto da temperatura de reação.

Foi igualmente testado o efeito da ordem de adição dos polímeros, pelo que se produziram nanopartículas FFv/CS e CS/FFv. Os ensaios realizados a temperatura ambiente contaram com a produção de NP FFv/CS e CS/FFv nos rácios de massa 4/1, 1/1 e 1/4. Os parâmetros tamanho e potencial zeta estão representados nas Figuras 4.4 e 4.5.

As NP FFv/CS demonstraram um aumento do efeito Tyndall desde o rácio 4/1 para o 1/4, tendo sido observado efeito Tyndall em todos os rácios. Ao analisar os parâmetros das NP FFv/CS (Figura 4.4) é possível observar um aumento gradual no tamanho das NP produzidas, que variou entre 213 e 1448 nm, do rácio 4/1 para o 1/4, demonstrando a influência que a concentração dos polímeros tem neste parâmetro ( $p < 0,05$ ). Quanto maior a concentração de CS comparativamente ao FFv e quanto mais quantidade de massa total de polímeros em solução, maiores os tamanhos das NP, o que é explicado exatamente por haver mais massa de polímeros a reagir e também à medida que avançamos nos rácios, de 4/1 para 1/4, serem adicionadas quantidades crescentes de um polímero de peso molecular ~116 kDa, cerca de cinco vezes o peso molecular de FFv (98). Na realidade, as partículas FFv/CS = 1/4 exibem um tamanho que já não permite a sua consideração como nanopartículas.

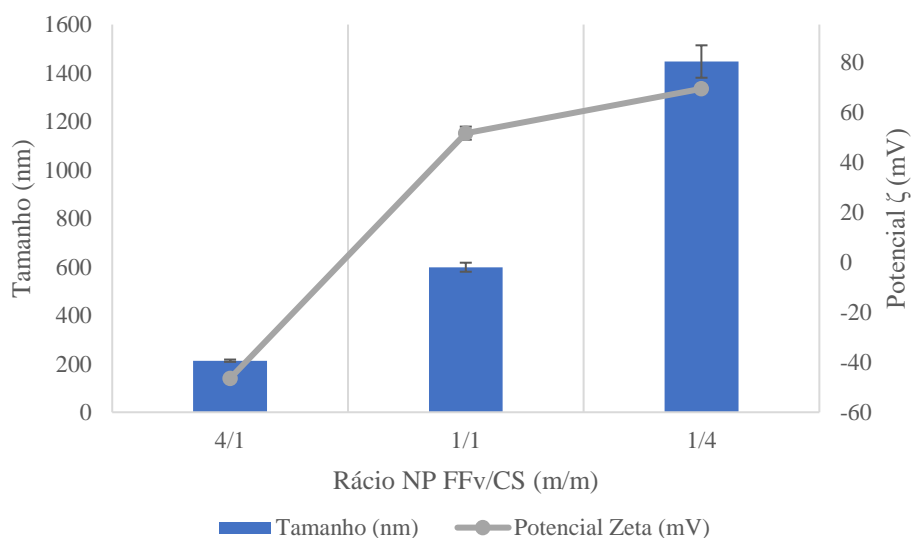


Figura 4.4 - Tamanho e potencial zeta das NP FFv/CS 4/1, 1/1 e 1/4 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (n=3).

Embora não se encontre representado no gráfico, o PDI destas NP demonstrou ser influenciado pela concentração dos polímeros, tendo sido observada uma variação dos

valores entre ~0,21 e 0,53, com tendência crescente entre os rácios FFv/CS = 4/1 e 1/4, demonstrando um aumento do PDI em função da presença de maior quantidade de CS, indicando uma polidispersão mais elevada. De entre todos os rácios, apenas as NP FFv/CS = 4/1 apresentaram valores de PDI em linha com o que é considerado satisfatório (< 0,3).

No caso do potencial zeta também se observaram algumas particularidades, sendo a mais evidente o facto de nestas nanopartículas FFv/CS se registarem valores de potencial zeta negativos no rácio 4/1, com inversão do sinal no rácio 1/1. Isto indica-nos que o FFv apresenta maior densidade de carga do que o fucoidan utilizado nas nanopartículas anteriormente descritas, derivadas de *S. muticum*, mas também indicia que a densidade de carga do fucoidan continua a ser inferior à do CS, uma vez que quando as massas se igualam (NP FFv/CS = 1/1) o potencial zeta é marcadamente positivo (+51 mV). Verifica-se assim que a concentração dos polímeros tem uma clara influência neste parâmetro ( $p < 0,05$ ). A observação de valores tão elevados de potencial zeta, que atingem cerca de +50 mV, é ainda uma garantia da estabilidade das NP. O aumento do potencial zeta em NP de fucoidan/quitosano ao aumentar a presença do CS já tinha sido previamente observado (43)(160).

Na produção de nanopartículas à base de FFv e CS, também se pretendeu verificar se a ordem de adição dos polímeros teria influência nas características das nanopartículas. Assim, além da formulação FFv/CS, descrita acima, também foi estudada a formulação CS/FFv, estando os resultados obtidos representados na Figura 4.5. Nestas partículas observou-se, a par das NP FFv/CS, um aumento do efeito Tyndall com o variar dos rácios de massa desde o 1/4 para 4/1, no entanto, as NP CS/FFv = 1/4 resultaram sempre em precipitação. Este efeito deveu-se provavelmente ao facto de a molécula de CS possuir vários grupos amina disponíveis para reagir com os grupos sulfato provenientes do FFv adicionado, havendo possivelmente uma neutralização de cargas que levou à precipitação. Para as partículas viáveis para produção, CS/FFv = 4/1 e 1/1, a figura mostra que, embora pouco acentuado, houve um aumento do tamanho das NP do rácio 4/1 para 1/1 ( $p < 0,05$ ), sendo que a formulação com maior proporção de CS é a que tem menor tamanho. Em todas as formulações mencionadas até este ponto, o tamanho das NP era sempre mais elevado quanto maior a quantidade de CS comparativamente ao fucoidan. No entanto, o facto de o tamanho aumentar de 4/1 para 1/1 pode ser explicado pensando não nos rácios entre os polímeros, mas sim na quantidade de massa total dos polímeros presente em solução. A produção das NP consiste na adição de volumes de soluções de diferentes

concentrações de um polímero, neste caso o FFv, à solução de um outro polímero, sendo o caso CS, este com uma massa fixa. Ou seja, para formar as nanopartículas com um rácio onde a massa de CS é predominante ( $CS/FFv = 4/1$ ) é necessário adicionar uma quantidade mínima de FFv, em comparação à massa de FFv adicionada quando estes polímeros ficam em concentrações de massa idênticas ( $CS/FFv = 1/1$ ). O aumento do tamanho das NP é então, possivelmente, resultante do facto de haver maior quantidade de massa total de polímeros em solução, podendo estes reagir e formar complexos de maiores dimensões.

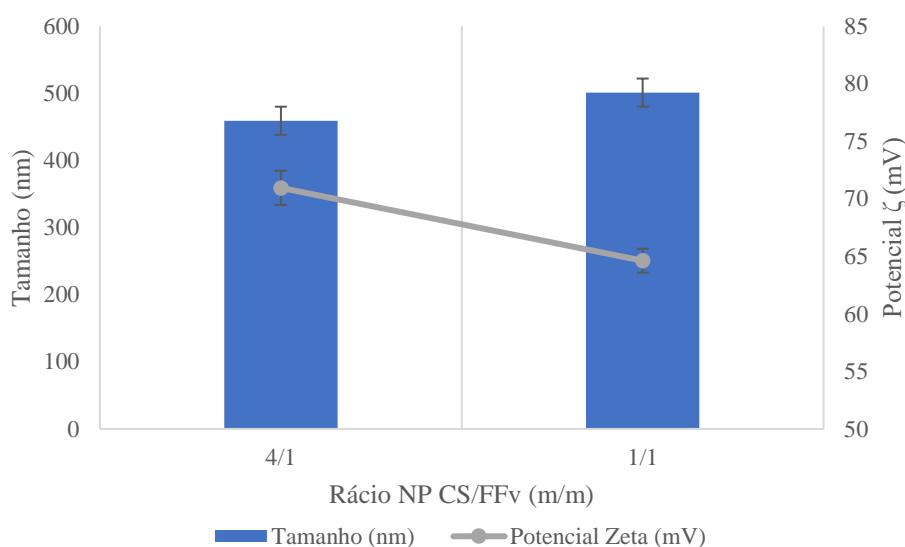


Figura 4.5 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/FFv 4/1 e 1/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (n=3).

Ao fazer uma comparação entre as NP CS/FFv e as FFv/CS descritas anteriormente, é possível verificar que há uma grande diferença de tamanhos entre as formulações FFv/CS 1/4 (1448 nm) e CS/FFv 4/1 (459 nm) onde os rácios de massa são os mesmos, o que sugere que a ordem de adição dos polímeros tem influência no tamanho das NP, uma particularidade que foi mencionada noutros trabalhos (43). No entanto, temos que considerar que as NP FFv/CS 1/4 têm uma concentração total de polímeros bastante maior que as NP CS/FFv 4/1, o que resultará em partículas tendencialmente maiores.

Ambas as formulações de CS/FFv apresentaram um PDI de cerca de 0,30, tendo assim um valor de polidispersão considerado adequado. O potencial zeta foi positivo e bastante elevado em ambos os casos, acima de +64 mV, o que é positivo para a estabilidade das nanopartículas. Maior carga de superfície foi observada quando o CS é o polímero com

maior massa em solução (CS/FFv = 4/1), diminuindo um pouco quando se adiciona mais FFv (de +71 mV para +64 mV) ( $p < 0,05$ ). Isto reflete a superioridade da densidade de carga do CS.

Para avaliar a influência da temperatura nos parâmetros destas formulações, foram selecionadas as NP FFv/CS 4/1 e CS/FFv 1/1 para produção a temperatura controlada, por apresentarem ambas bom efeito Tyndall comparativamente com as restantes formulações. O tamanho e potencial zeta das NP estudadas estão representados nas Figuras 4.6 e 4.7, respetivamente, apresentando-se os parâmetros a temperatura ambiente e temperatura controlada para facilitar a comparação.

Foi possível observar em ambos os casos uma diminuição, ainda que pouco acentuada (5 – 10%), do tamanho das NP quando comparando os resultados obtidos a temperatura controlada com os previamente obtidos a temperatura ambiente. No entanto, apenas nas NP CS/FFv 1/1 a diferença foi significativa ( $p < 0,05$ ), permitindo estabelecer uma relação entre a temperatura do meio de reação durante a produção das NP e o seu tamanho. Relativamente ao potencial zeta, não houve alterações que se esperem poder induzir alguma diferença de comportamento, com variações nominais muito reduzidas, embora nas NP FFv/CS 4/1 a alteração tenha sido estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), com uma diminuição (em valor absoluto) de cerca de 10% quando a preparação decorre a temperatura controlada.

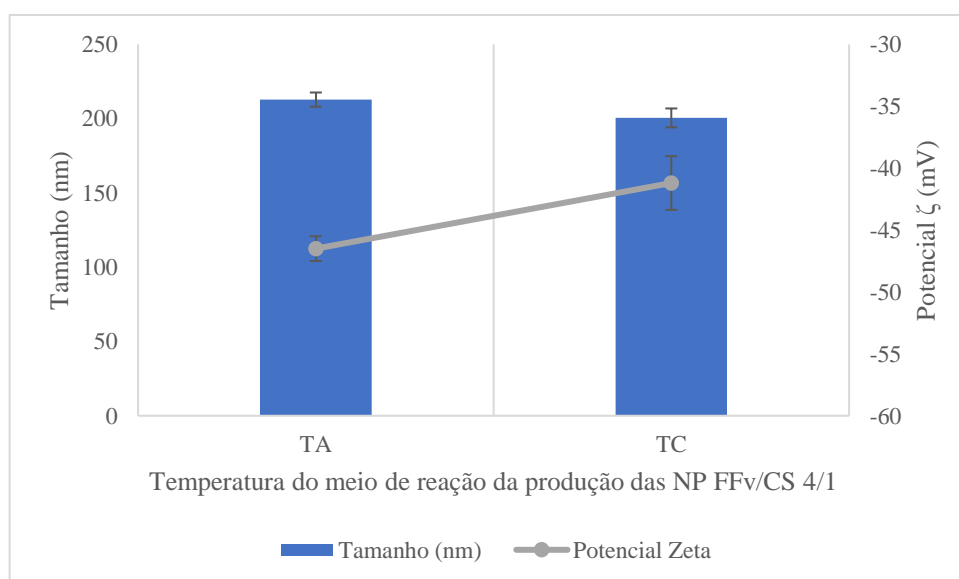


Figura 4.6 - Tamanho e potencial zeta das NP FFv/CS 4/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3).

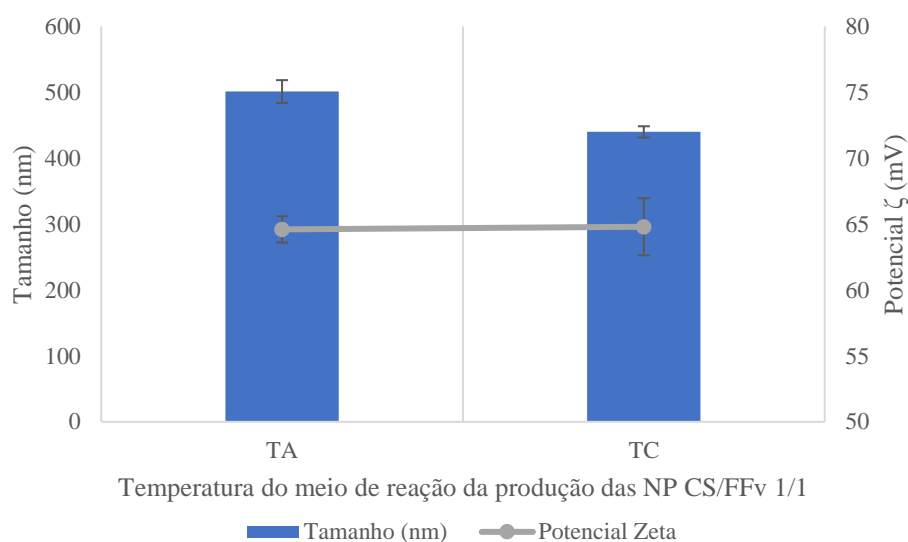


Figura 4.7 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/FFv 1/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3).

#### 4.3 Caracterização das nanopartículas produzidas a partir de carragenina

Com o mesmo objetivo de estudo das NP à base de FFv, foram produzidas NP a partir de carragenina e quitosano, denominadas NP CS/CRG, de forma a alargar os polímeros utilizados ao estudar a variável temperatura do meio de reação. As NP de CS/CRG foram produzidas com rácios de massa 5/1, 4/1 e 3/1 a temperatura ambiente, estando o seu tamanho e potencial zeta representados na Figura 4.8.

A figura mostra um aumento do tamanho das NP em função do aumento da concentração de CRG, comparativamente à concentração de CS ( $p < 0,05$ ). Isto deve-se ao facto de a carragenina também ser um polímero de relativamente grandes dimensões e, à medida que se avança nos rácios de 5/1 para 3/1, é adicionada mais quantidade deste polímero o qual vai interagir mais com o quitosano e formar NP de maiores dimensões. Este comportamento já tinha sido previamente documentado (98,161). Todas as formulações apresentaram um PdI de aproximadamente 0,44, o que mostra um nível de polidispersão relativamente elevado. No que se refere ao potencial zeta, todas as nanopartículas apresentaram um potencial muito elevado, acima de +65 mV, o que contribui positivamente para a sua estabilidade. Surpreendentemente, no entanto, foi observado um aumento nominal do potencial zeta associado ao aumento da concentração de carragenina de CS/CRG 5/1 para 4/1 para 3/1, embora apenas estatisticamente

significativo de 5/1 para 4/1 ( $p < 0,05$ ). Na verdade, o que seria de esperar e o que foi observado em vários outros estudos, seria uma diminuição do potencial zeta à medida que era adicionada uma maior quantidade de carragenina devido à neutralização da carga do quitosano pelos grupos sulfato da carragenina (98,161). Não obstante a diferença significativa observada, a realidade é que a alteração pouco afetará o comportamento das nanopartículas, uma vez que em qualquer das situações a carga superficial é bastante elevada.

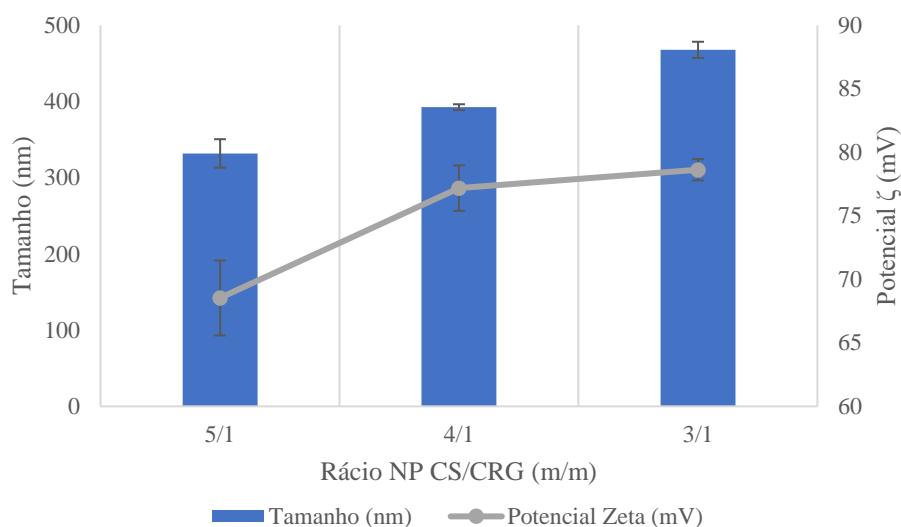


Figura 4.8 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG 5/1, 4/1 e 3/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (n=3).

Para o estudo da influência da temperatura do meio de reação selecionaram-se as NP CS/CRG 4/1 e 3/1, uma vez que apresentaram efeito Tyndall a temperatura ambiente. O tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG = 4/1 e CS/CRG = 3/1, ambas a temperatura ambiente e temperatura controlada, estão representados nas Figuras 4.9 e 4.10, respetivamente.

Ao analisar os tamanhos obtidos a temperatura controlada verificou-se primeiramente que a relação entre o aumento do tamanho e a adição de mais carragenina à solução se manteve a temperaturas mais baixas ( $p < 0,05$ ).

Comparando então as NP produzidas a temperatura ambiente e a temperatura controlada, verificou-se um comportamento contrário ao registado nas NP à base de FFv, ou seja, um ligeiro aumento do tamanho das NP o qual se relacionou com a diminuição da temperatura do meio de reação, embora unicamente na formulação CS/CRG = 4/1 ( $p$

< 0,05). Ambos PDI e potencial zeta demonstraram não ser influenciados pela alteração da temperatura do meio de reação em nenhuma das formulações estudadas.

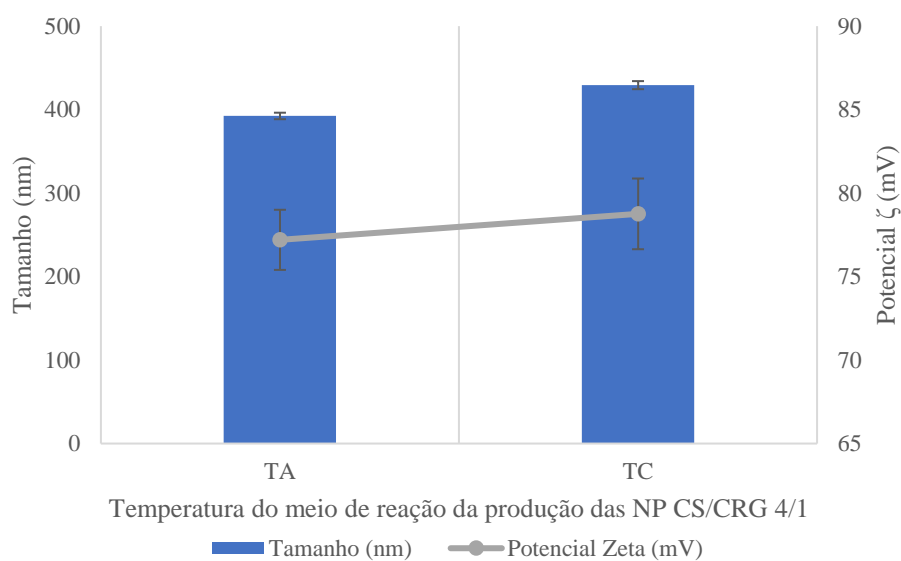


Figura 4.9 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG 4/1 (m/m) preparadas a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3).

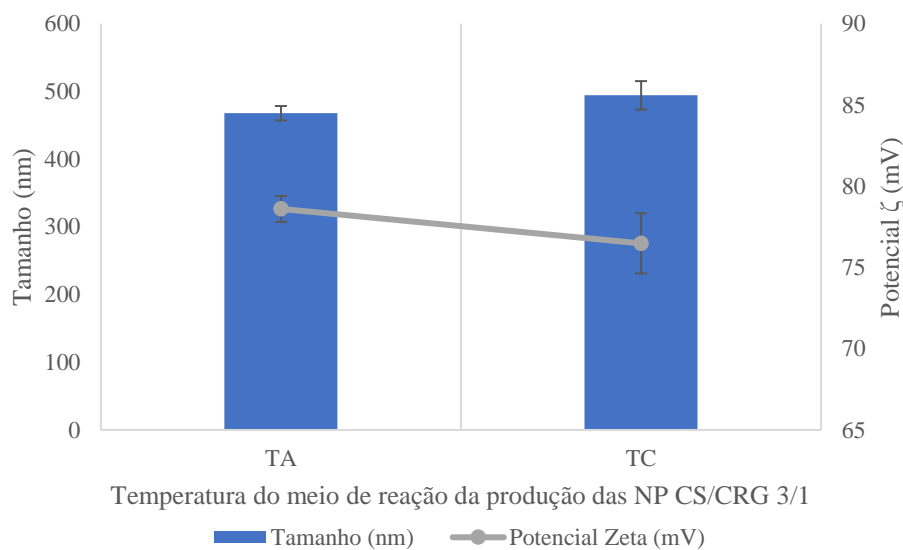


Figura 4.10 - Tamanho e potencial zeta das NP CS/CRG 3/1 a temperatura ambiente (TA) e temperatura controlada (TC; n=3).

## 5. Conclusão

Este trabalho tinha como um dos objetivos avaliar a capacidade dos extratos de *Sargassum muticum* (FSm) para a formulação de NP poliméricas utilizando outro polímero de origem marinha, o CS, e caracterizar as NP produzidas em termos de tamanho, PdI e potencial zeta para poder estudar como os parâmetros de extração afetam os parâmetros das NP.

As NP de FSm/CS produzidas apresentaram tamanhos compreendidos entre cerca de 280 e 1040 nm. As NP de menor tamanho foram produzidas para FSm/CS = 4/1 (m/m) e as de maior tamanho para FSm/CS = 1/4 (m/m). Estes resultados demonstraram que as concentrações dos polímeros têm influência no tamanho das NP. Neste caso, quando a quantidade de FSm é superior à de CS obtém-se um tamanho menor de NP do que quando está presente uma maior massa de CS. Para além disso, observou-se também uma relação entre o aumento do tamanho das NP FSm/CS e a temperatura e tempo de extração mais elevados a que os extratos de *S. muticum* tinham sido sujeitos. A polidispersão destas NP, tal como o tamanho, tende a aumentar de acordo com a massa de CS que está presente em solução e também consoante a maior temperatura e tempo de extração dos extratos, significando que quanto mais extremas são as condições de extração dos extratos mais polidispersas são as NP. No entanto, ao contrário dos dois parâmetros anteriores, o potencial zeta demonstrou variar apenas entre rácios devido à quantidade de CS presente, mas estabilizar dentro destes enquanto se variam as condições de obtenção dos extratos. Para além disso, o potencial zeta destas partículas mostrou ser sempre positivo, demonstrando que o CS possuía sempre maior densidade de carga que o FSm.

O outro objetivo deste trabalho consistia em avaliar qual a influência da temperatura de reação durante a produção de NP, nos parâmetros físico-químicos das mesmas. Para isso foram produzidas NP com base em FFv e CS e também CRG e CS.

As NP FFv/CS demonstraram que a concentração dos polímeros tem influência tanto no tamanho das NP, como no PdI e potencial zeta, onde a maior presença de CS leva a um aumento dos parâmetros descritos ( $p < 0,05$ ), o que é concordante com o observado para as NP FSm/CS. Para além disso, a formulação FFv/CS = 4/1 foi a única que demonstrou potencial zeta negativo, indicando que o FFv tem maior densidade de carga negativa que o FSm, uma vez que as NP FSm/CS = 4/1 apresentaram potencial zeta positivo. As NP CS/FFv demonstraram que a influência que a concentração dos polímeros

tem no tamanho das NP produzidas é o contrário do observado nas NP FFv/CS, ou seja, quanto maior a massa de CS menor o tamanho das NP formadas. No entanto estes resultados podem ser explicados por haver cada vez mais quantidade total de polímeros em solução à medida que se adiciona mais FFv, resultando em maiores tamanhos de NP.

Os dados obtidos das NP CS/CRG suportam os correspondentes das NP CS/FFv na medida em que se observou uma diminuição do tamanho das NP quando o polímero negativo, neste caso CRG, foi adicionado ao CS, mesmo estando presente CS numa proporção superior. Isto foi contrário ao que aconteceu com as NP FSm/CS e FFv/CS, em que se observou um aumento do tamanho das NP quando havia maior quantidade de CS e este foi adicionado ao polímero negativo. Em todos os casos o tamanho das NP aumentou à medida que a massa total de polímeros em solução aumentou. Demonstrou-se que a concentração dos polímeros influencia também o potencial zeta das NP CS/CRG.

Relativamente à comparação dos dados a temperatura ambiente e temperatura controlada das formulações selecionadas de FFv, FFv/CS = 4/1 e CS/FFv = 1/1, determinou-se apenas influência da temperatura de reação na diminuição de tamanho das NP CS/FFv = 1/1 e na diminuição do valor absoluto do potencial zeta das NP FFv/CS = 4/1, embora sempre com pouca expressão. As duas formulações de CS/CRG selecionadas para produção de NP a temperatura controlada, CS/CRG = 4/1 e 3/1, demonstraram que o tamanho varia com o rácio dos polímeros a temperatura controlada, tal como acontece a temperatura ambiente. No entanto, verificou-se que a variação de temperatura de reação apenas influenciou o tamanho da formulação CS/CRG = 4/1 e, novamente, com diferenças dos valores nominais reduzidas, sendo que o esperado da ação destas partículas não é alterado.

Em suma, ao comparar todas as NP produzidas a temperatura ambiente e a temperatura controlada e tendo em conta todas as observações acima descritas, conclui-se que, de um modo geral, a variável temperatura de reação não aparenta ter impacto nas características de tamanho, PDI e potencial zeta das NP, tanto à base de FFv e CS como de CRG e CS.

## 6. Bibliografia

1. Lomartire S, Marques JC, Gonçalves AMM. An overview to the health benefits of seaweeds consumption. *Mar. Drugs*. 2021;19.
2. Craigie JS. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 2011;23:371–93.
3. HE ML, HOLLWICH W, RAMBECK WA. Supplementation of algae to the diet of pigs: a new possibility to improve the iodine content in the meat. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 2002;86:97–104.
4. Ramalho Ribeiro A, Gonçalves A, Bandarra N, et al. Natural fortification of trout with dietary macroalgae and selenised-yeast increases the nutritional contribution in iodine and selenium. *Food Res. Int.* 2016;
5. Chatzissavvidis C, Therios I. Role of algae in agriculture. Nova Science Publishers, Inc.; 2014.
6. Galina D, Porto PS da S, de Freitas RR. Estudo das tecnologias para produção de biodiesel a partir de microalgas do gênero nannochloropsis. *Res. Soc. Dev.* 2018;7(12):01–28.
7. Peñalver R, Lorenzo JM, Ros G, et al. Seaweeds as a functional ingredient for a healthy diet. *Mar. Drugs*. 2020;18.
8. Tavares Estevam AC, Alonso Buriti FC, de Oliveira TA, et al. Effect of aqueous extract of the seaweed gracilaria domingensis on the physicochemical, microbiological, and textural features of fermented milks. *J. Food Sci.* 2016;81(4):C874–80.
9. Suresh B, Ravishankar GA. Phytoremediation—A novel and promising approach for environmental clean-up. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2004;24(2–3):97–124.
10. Ariede MB, Candido TM, Jacome ALM, et al. Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Res.* 2017;25:483–7.
11. Y. Sun, M. Chavan, Cosmetic Compositions Comprising Marine Plants, 14/077 934, (2014).
12. Cardozo KHM, Guaratini T, Barros MP, et al. Metabolites from algae with economical impact. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2007;146(1–2):60–78.
13. Usman A, Khalid S, Usman A, et al. Algal polysaccharides, novel application, and outlook. In: *Algae Based Polymers, Blends, and Composites*. Elsevier; 2017. page 115–53.
14. Berteau O, Mulloy B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. *Glycobiology*. 2003;13(6):29R – 40.
15. Kraan S. Algal polysaccharides, novel applications and outlook. In: *Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. InTech; 2012.
16. JNascimento. *Ulva* . 2013 [cited 2022 Sep 24]. Available from:

<https://jvitorino.wordpress.com/2013/02/19/ulva/>.

17. *Saccorhiza polyschides* (Lightfoot) Batters, 1902 Furbelows . [cited 2022 Sep 24]. Available from: <https://www.bioimages.org.uk/image.php?id=101777>.
18. *Plocamium cartilagineum* ssp. *pacificum* . [cited 2022 Sep 24]. Available from: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/339051-Plocamium-cartilagineum-pacificum>.
19. Kraan S. *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt in Ireland: an invasive species on the move. *J. Appl. Phycol.* 2008;20(5):375–82.
20. Critchley AT. *Sargassum muticum*: a taxonomic history including world-wide and western Pacific distributions. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom.* 1983;63:617–25.
21. Moorthi PV, Balasubramanian C. Antimicrobial properties of marine seaweed, *Sargassum muticum* against human pathogens. *J. Coast. Life Med.* 2015;3(2):122–5.
22. Álvarez-Viñas M, Flórez-Fernández N, González-Muñoz MJ, et al. Influence of molecular weight on the properties of *Sargassum muticum* fucoidan. *Algal Res.* 2019;38.
23. Pinteus S, Lemos M, Silva J, et al. An insight into *Sargassum muticum* cytoprotective mechanisms against oxidative stress on a human cell in vitro model. *Mar. Drugs.* 2017;15:353.
24. Puspita M, Déniel M, Widowati I, et al. Total phenolic content and biological activities of enzymatic extracts from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. *J. Appl. Phycol.* 2017;29:2521–37.
25. Pizzolla P. Wireweed (*Sargassum muticum*) . Tyler-Walters H. Hiscock K. *Mar. Life Inf. Netw. Biol. Sensit. Key Inf. Rev. [on-line]. Plymouth Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*2008 [cited 2022 Sep 24]. Available from: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1477>.
26. Rice-Evans C, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997;2(4):152–9.
27. Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI, et al. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. In: Phenolic Compounds - Biological Activity. InTech; 2017. page 1–24.
28. Fitton J, Dell’Acqua G, Gardiner VA, et al. Topical benefits of two fucoidan-rich extracts from marine macroalgae. *Cosmetics.* 2015;2:66–81.
29. Blunden G, Challen SB, Woods DL. Seaweed extracts as fertilisers. *J. Sci. Food Agric.* 1968;19:289–93.
30. Campbell M, Ortuño J, Ford L, et al. The effect of ensiling on the nutritional composition and fermentation characteristics of brown seaweeds as a ruminant feed ingredient. *Animals.* 2020;10.
31. Catarino M, Silva A, Mateus N, et al. Optimization of phlorotannins extraction from *Fucus vesiculosus* and evaluation of their potential to prevent metabolic disorders. *Mar. Drugs.* 2019;17.

32. Soares C, Paíga P, Marques M, et al. Multi-step subcritical water extracts of *Fucus vesiculosus* L. and *Codium tomentosum* stackhouse: Composition, health-benefits and safety. *Processes*. 2021;9.
33. Obluchinskaya ED, Pozharitskaya ON, Flisyuk E V., et al. Formulation, optimization and in vivo evaluation of fucoidan-based cream with anti-inflammatory properties. *Mar. Drugs*. 2021;19.
34. White N. Bladder wrack (*Fucus vesiculosus*) . Tyler-Walters H. Hiscock K. *Mar. Life Inf. Netw. Biol. Sensit. Key Inf. Rev. [on-line]. Plymouth Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*2008 [cited 2022 Sep 24]. Available from: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1330>.
35. Catarino M, Silva A, Cardoso S. Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Mar. Drugs*. 2018;16.
36. Hosokawa M, Okada T, Mikami N, et al. Bio-functions of marine carotenoids. *Food Sci. Biotechnol.* 2009;18(1):1–11.
37. Rodriguez-Jasso R, Mussatto S, Pastrana L, et al. Chemical composition and antioxidant activity of sulphated polysaccharides extracted from *Fucus vesiculosus* using different hydrothermal processes. *Chem. Pap.* 2014;68(2):203–9.
38. Tyśkiewicz K, Tyśkiewicz R, Konkol M, et al. Antifungal properties of *Fucus vesiculosus* L. supercritical fluid extract against *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum*. *Molecules*. 2019;24(3518).
39. Ayrapetyan ON, Obluchinskaya ED, Zhurishkina E V., et al. Antibacterial properties of fucoidans from the brown algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea. *Biology (Basel)*. 2021;10(67).
40. Catarino MD, Fernandes I, Oliveira H, et al. Antitumor activity of *Fucus vesiculosus*-derived phlorotannins through activation of apoptotic signals in gastric and colorectal tumor cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22.
41. Cabral EM, Mondala JRM, Oliveira M, et al. Influence of molecular weight fractionation on the antimicrobial and anticancer properties of a fucoidan rich-extract from the macroalgae *Fucus vesiculosus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2021;186:994–1002.
42. Hameed SI, Al-Shahwany AW, Salih SJ. Evaluation of the activity of some plants extracts on thyroid gland regulation in female albino rats. *Iraqi J. Sci.* 2020;61(2):254–65.
43. Flórez-Fernández N, Álvarez-Vinãs M, Guerreiro F, et al. Hydrothermal processing of *Laminaria ochroleuca* for the production of crude extracts used to formulate polymeric nanoparticles. *Mar. Drugs*. 2020;18(7).
44. Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M. Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydr. Polym.* 2007;69:530–7.
45. Li B, Lu F, Wei X, et al. Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*. 2008;13(8):1671–95.
46. Mak W, Hamid N, Liu T, et al. Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: Monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydr. Polym.*

- 2013;95:606–14.
47. Citkowska A, Szekalska M, Winnicka K. Possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms. *Mar. Drugs*. 2019;17:458.
  48. Cunha L, Grenha A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar. Drugs*. 2016;14(3).
  49. Rocha de Souza MC, Marques CT, Guerra Dore CM, et al. Antioxidant activities of sulfated polysaccharides from brown and red seaweeds. *J. Appl. Phycol.* 2007;19:153–60.
  50. Mišurcová L, Škrovánková S, Samek D, et al. Health benefits of algal polysaccharides in human nutrition. In: *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012. page 75–145.
  51. Wijesekara I, Pangestuti R, Kim SK. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 2011;84(1):14–21.
  52. Marudhupandi T, Ajith Kumar TT, Lakshmanasenthil S, et al. In vitro anticancer activity of fucoidan from *Turbinaria conoides* against A549 cell lines. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;72:919–23.
  53. Sezer AD, Cevher E. Fucoidan: A versatile biopolymer for biomedical applications. In: *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*. Springer International Publishing; 2011. page 377–406.
  54. Cardoso M, Costa R, Mano J. Marine origin polysaccharides in drug delivery systems. *Mar. Drugs*. 2016;14:34.
  55. Hernández-Carmona G, Freile-Pelegrín Y, Hernández-Garibay E. Conventional and alternative technologies for the extraction of algal polysaccharides. In: *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Woodhead Publishing Limited; 2013. page 475–516.
  56. Atkins EDT, Nieduszynski IA, Mackie W, et al. Structural components of alginic acid. I. The crystalline structure of poly- $\beta$ -D-mannuronic acid. Results of X-ray diffraction and polarized infrared studies. *Biopolymers*. 1973;12:1865–78.
  57. Haug A, Larsen B, Smidsrod O. A study on the constitution of alginic acid by partial acid hydrolysis. In: *Acta Chemica Scandinavica*. 1966. page 183–90.
  58. Juárez GAP, Spasojevic M, Faas MM, et al. Immunological and technical considerations in application of alginate-based microencapsulation systems. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2014;2(26):1–15.
  59. Xing M, Cao Q, Wang Y, et al. Advances in research on the bioactivity of alginate oligosaccharides. *Mar. Drugs*. 2020;18:144.
  60. Wang X, Liu F, Gao Y, et al. Anti-obesity effects and changes of colonic transcriptome by sodium alginate on high-fat diet induced obese mice. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018.
  61. Pereira L, van de Velde F. Portuguese carrageenophytes: Carrageenan composition and geographic distribution of eight species (Gigartinales, Rhodophyta).

- Carbohydr. Polym.* 2011;84:614–23.
62. Lahaye M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J. Appl. Phycol.* 2001;13(2):173–84.
  63. Zia KM, Tabasum S, Nasif M, et al. A review on synthesis, properties and applications of natural polymer based carrageenan blends and composites. *Int. J. Biol. Macromol.* 2017.
  64. Campo VL, Kawano DF, Silva DB da, et al. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review. *Carbohydr. Polym.* 2009;77:167–80.
  65. Daniel-da-Silva AL, Lopes AB, Gil AM, et al. Synthesis and characterization of porous  $\kappa$ -carrageenan/calcium phosphate nanocomposite scaffolds. *J. Mater. Sci.* 2007;42:8581–91.
  66. Hench LL. Bioceramics: From concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991;74(7):1487–510.
  67. González JI, Ossa CPO. Injectability evaluation of bone-graft substitutes based on carrageenan and hydroxyapatite nanorods. In: *The Minerals, Metals & Materials Society*. 2017. page 33–46.
  68. Bhattacharyya S, Liu H, Zhang Z, et al. Carrageenan-induced innate immune response is modified by enzymes that hydrolyze distinct galactosidic bonds. *J. Nutr. Biochem.* 2010;21:906–13.
  69. Popa EG, Caridade SG, Mano JF, et al. Chondrogenic potential of injectable  $\kappa$ -carrageenan hydrogel with encapsulated adipose stem cells for cartilage tissue-engineering applications. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013;9:550–63.
  70. Winter GD. Formation of the scab and the rate of epithelization of superficial wounds in the skin of the young domestic pig. *Nature.* 1962;193(4812):293–4.
  71. Nair A V., Raman M, Doble M. Cyclic  $\beta$ -(1→3) (1→6) glucan/carrageenan hydrogels for wound healing applications. *R. Soc. Chem. Adv.* 2016;6:98545–53.
  72. Skoler-Karppoff S, Ramjee G, Ahmed K, et al. Efficacy of carraguard for prevention of HIV infection in women in South Africa: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008;372:1977–87.
  73. Vlieghe P, Clerc T, Pannecouque C, et al. Synthesis of new covalently bound  $\kappa$ -carrageenan–AZT conjugates with improved anti-HIV activities. *J. Med. Chem.* 2002;45(6):1275–83.
  74. Zhou Y, Yang H, Hu H, et al. Bioremediation potential of the macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Rhodophyta) integrated into fed fish culture in coastal waters of north China. *Aquaculture.* 2006;252:264–76.
  75. Hawkins WW, Leonard VG. The antithrombic activity of carrageenin in human blood. *Can. J. Biochem. Physiol.* 1963;41:1325–7.
  76. Kindness G, Williamson FB, Long WF. Effect of polyanetholesulphonic acid and xylan sulphate on antithrombin III activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1979;88(3):1062–8.

77. Roberts GAF. Structure of chitin and chitosan. In: Chitin Chemistry. Macmillan Education UK; 1992. page 1–53.
78. Je JY, Kim SK. Antimicrobial action of novel chitin derivative. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2006;1760(1):104–9.
79. Dutta PK, Dutta J, Tripathi V. Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *J. Sci. Ind. Res.* 2004;63:20–31.
80. Teixeira-Costa BE, Andrade CT. Chitosan as a valuable biomolecule from seafood industry waste in the design of green food packaging. *Biomolecules.* 2021;11(1599):1–19.
81. Sarti F, Bernkop-Schnürch A. Chitosan and thiolated chitosan. In: Advances in Polymer Science. 2011. page 93–110.
82. Zhu A, Chan-Park MB, Dai S, et al. The aggregation behavior of O-carboxymethylchitosan in dilute aqueous solution. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2005;43:143–9.
83. Matica, Aachmann, Tøndervik, et al. Chitosan as a wound dressing starting material: Antimicrobial properties and mode of action. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20.
84. Philibert T, Lee BH, Fabien N. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2017;181(4):1314–37.
85. Trivedi V, Satia M, Deschamps A, et al. Single-blind, placebo controlled randomised clinical study of chitosan for body weight reduction. *Nutr. J.* 2016;15(3):1–12.
86. Bellich B, D’Agostino I, Semeraro S, et al. “The good, the bad and the ugly” of chitosans. *Mar. Drugs.* 2016;14.
87. Lopez-Santamarina A, Mondragon A del C, Lamas A, et al. Animal-origin prebiotics based on chitin: An alternative for the future? A critical review. *Foods.* 2020;9(6):782.
88. Matica A, Menghiu G, Ostafe V. Toxicity of chitosan based products. *New Front. Chem.* 2017;26(1):65–74.
89. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62:3–11.
90. Lagarto A, Merino N, Valdes O, et al. Safety evaluation of chitosan and chitosan acid salts from *Panurilus argus* lobster. *Int. J. Biol. Macromol.* 2015;72:1343–50.
91. Zivarpour P, Hallajzadeh J, Asemi Z, et al. Chitosan as possible inhibitory agents and delivery systems in leukemia. *Cancer Cell Int.* 2021;21(1):544.
92. Bhavsar C, Momin M, Gharat S, et al. Functionalized and graft copolymers of chitosan and its pharmaceutical applications. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2016.
93. Friedman M, Juneja VK. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. *J. Food Prot.* 2010;73(9):1737–61.
94. Soane R., Frier M, Perkins A., et al. Evaluation of the clearance characteristics of

- bioadhesive systems in humans. *Int. J. Pharm.* 1999;178:55–65.
95. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural–origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007;59:207–33.
  96. Kwak JY. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar. Drugs.* 2014;12:851–70.
  97. Cohen SM, Ito N. A critical review of the toxicological effects of carrageenan and processed eucheuma seaweed on the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Toxicol.* 2002;32(5):413–44.
  98. Grenha A, Gomes ME, Rodrigues M, et al. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2010;92A:1265–72.
  99. Huang YC, Yang YT. Effect of basic fibroblast growth factor released from chitosan-fucoidan nanoparticles on neurite extension. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013.
  100. Uzunalli G. Nanomaterials for wound healing. In: *Nanomaterials for Regenerative Medicine. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine.* 2019. page 81–117.
  101. Barbosa AI, Costa Lima SA, Reis S. Application of pH-responsive fucoidan/chitosan nanoparticles to improve oral quercetin delivery. *Molecules.* 2019;24(346):1–14.
  102. Shi L. Bioactivities, isolation and purification methods of polysaccharides from natural products: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 2016;92:37–48.
  103. Ibañez E, Herrero M, Mendiola JA, et al. Extraction and characterization of bioactive compounds with health benefits from marine resources: macro and micro algae, cyanobacteria, and invertebrates. In: *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications.* 2012. page 55–98.
  104. Rodríguez Seoane P, Flórez-Fernández N, Conde Piñeiro E, et al. Microwave-assisted water extraction. In: *Water Extraction of Bioactive Compounds.* Elsevier; 2017. page 163–98.
  105. Flórez-Fernández N, López-García M, González-Muñoz MJ, et al. Ultrasound-assisted extraction of fucoidan from *Sargassum muticum*. *J. Appl. Phycol.* 2017;29:1553–61.
  106. Flórez-Fernández N, Torres MD, González-Muñoz MJ, et al. Recovery of bioactive and gelling extracts from edible brown seaweed *Laminaria ochroleuca* by non-isothermal autohydrolysis. *Food Chem.* 2019;277(October 2018):353–61.
  107. Flórez-Fernández N, Casas MP, González Muñoz MJ, et al. Combination of water-based extraction technologies. In: *Water Extraction of Bioactive Compounds.* Elsevier; 2017. page 421–49.
  108. González-Ballesteros N, Flórez-Fernández N, Torres MD, et al. Synthesis, process optimization and characterization of gold nanoparticles using crude fucoidan from the invasive brown seaweed *Sargassum muticum*. *Algal Res.* 2021;58.
  109. Leon L, Chung EJ, Rinaldi C. A brief history of nanotechnology and introduction

- to nanoparticles for biomedical applications. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020. page 1–4.
110. Elsabahy M, Wooley KL. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41(7):2545–61.
  111. Gundogdu E, Yurdasiper A. Drug transport mechanism of oral antidiabetic nanomedicines. *Int. J. Endocrinol. Metab.* 2014;12(1):1–5.
  112. Singh D, Rashid M, Hallan SS, et al. Pharmacological evaluation of nasal delivery of selegiline hydrochloride-loaded thiolated chitosan nanoparticles for the treatment of depression. *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2016;44(3):865–77.
  113. Rodrigues S, Grenha A. Activation of macrophages: Establishing a role for polysaccharides in drug delivery strategies envisaging antibacterial therapy. *Curr. Pharm. Des.* 2015;21(33):4869–87.
  114. Shah NK, Torrico Guzmán EA, Wang Z, et al. Routes of administration for nanocarriers. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020. page 67–87.
  115. Medina C, Santos-Martinez MJ, Radomski A, et al. Nanoparticles: Pharmacological and toxicological significance. *Br. J. Pharmacol.* 2007;150:552–8.
  116. Mc Carthy DJ, Malhotra M, O’Mahony AM, et al. Nanoparticles and the blood-brain barrier: Advancing from in-vitro models towards therapeutic significance. *Pharm. Res.* 2014.
  117. Jarai BM, Kolewe EL, Stillman ZS, et al. Polymeric nanoparticles. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020. page 303–24.
  118. Fedel M, Endogan T, Hasirci N, et al. Blood compatibility of polymers derived from natural materials. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2012;27(4):295–312.
  119. Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006;58:487–99.
  120. Cascone MG, Sim B, Sandra D. Blends of synthetic and natural polymers as drug delivery systems for growth hormone. *Biomaterials.* 1995;16:569–74.
  121. Merkel TJ, Jones SW, Herlihy KP, et al. Using mechanobiological mimicry of red blood cells to extend circulation times of hydrogel microparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108(2):586–91.
  122. Vauthier C. Polymer nanoparticles for in vivo applications: Progress on preparation methods and future challenges. In: *Polymer Nanoparticles for Nanomedicines*. Springer International Publishing; 2016. page 3–16.
  123. Zhang S, Sun HJ, Hughes AD, et al. Self-assembly of amphiphilic Janus dendrimers into uniform onion-like dendrimersomes with predictable size and number of bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;1–6.
  124. Parelkar SS, Letteri R, Chan-Seng D, et al. Polymer–peptide delivery platforms: Effect of oligopeptide orientation on polymer-based DNA delivery. *Biomacromolecules.* 2014;15:1328–36.

125. Duncan R. The dawning era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003;2:347–60.
126. Janes KA, Calvo P, Alonso MJ. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001;47:83–97.
127. Carvalho ELS, Grenha A, Remuñán-López C, et al. Mucosal delivery of liposome–chitosan nanoparticle complexes. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier; 2009. page 289–312.
128. Grenha A. Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *J. Drug Target.* 2012;20(4):291–300.
129. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2010;62:83–99.
130. Wani TU, Pandith AH, Sheikh FA. Polyelectrolytic nature of chitosan: Influence on physicochemical properties and synthesis of nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2021;65:102730.
131. Hamman JH. Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Mar. Drugs.* 2010;8:1305–22.
132. Hu Y, Jiang X, Ding Y, et al. Synthesis and characterization of chitosan–poly(acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials.* 2002;23:3193–201.
133. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, et al. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2006;53:193–202.
134. Teijeiro-Osorio D, Remuñán-López C, Alonso MJ. New generation of hybrid poly/oligosaccharide nanoparticles as carriers for the nasal delivery of macromolecules. *Biomacromolecules.* 2009;10:243–9.
135. Safari H, Kin-Hun Lee J, Eniola-Adefeso O. Effects of shape, rigidity, size, and flow on targeting. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020. page 55–66.
136. de la Fuente M, Csaba N, Garcia-Fuentes M, et al. Nanoparticles as protein and gene carriers to mucosal surfaces. *Nanomedicine.* 2008;3(6):845–57.
137. Wang JJ, Zeng ZW, Xiao RZ, et al. Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carriers. *Int. J. Nanomedicine.* 2011;6:765–74.
138. Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan nanoparticles: A promising system in novel drug delivery. *Chem. Pharm. Bull.* 2010;58(11):1423–30.
139. Kraemer EO, Dexter ST. The light-scattering capacity (Tyndall effect) and colloidal behavior of gelatine sols and gels. *J. Phys. Chem.* 1927;31(5):764–82.
140. Lunawat R. What is the Tyndall effect? . 2022 [cited 2022 Sep 24]. Available from: <https://www.scienceabc.com/pure-sciences/what-is-tyndall-effect.html>.
141. Kumar A, Dixit CK. Methods for characterization of nanoparticles. In: *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids*. Elsevier; 2017. page 43–58.

142. Hall JB, Dobrovolskaia MA, Patri AK, et al. Characterization of nanoparticles for therapeutics. *Nanomedicine*. 2007;2(6):789–803.
143. Food and Drug Administration. Considering whether an FDA-regulated product involves the application of nanotechnology: Guidance for industry. 2014.
144. Boverhof DR, Bramante CM, Butala JH, et al. Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015;73:137–50.
145. Jani P, Halbert GW, Langridge J, et al. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *J. Pharm. Pharmacol.* 1990;42:821–6.
146. Desai MP, Labhasetwar V, Amidon GL, et al. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size. *Pharm. Res.* 1996;13(12):1838–45.
147. Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; What is the appropriate target? *Theranostics*. 2014;4(1):81–9.
148. Chikaura H, Nakashima Y, Fujiwara Y, et al. Effect of particle size on biological response by human monocyte-derived macrophages. *Biosurface and Biotribology*. 2016;2:18–25.
149. Moghimi SM, Porter CJH, Muir IS, et al. Non-phagocytic uptake of intravenously injected microspheres in rat spleen: Influence of particle size and hydrophilic coating. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;177(2):861–6.
150. He C, Hu Y, Yin L, et al. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials*. 2010;31:3657–66.
151. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: Considerations and caveats. *Nanomedicine*. 2008;3(5):703–17.
152. Hirn S, Semmler-Behnke M, Schleh C, et al. Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011;77:407–16.
153. Berkland C, King M, Cox A, et al. Precise control of PLG microsphere size provides enhanced control of drug release rate. *J. Control. Release*. 2002;82:137–47.
154. Kaszuba M, Corbett J, Watson FM, et al. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philos. Trans. R. Soc. A*. 2010;368:4439–51.
155. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *J. Control. Release*. 2016;235:337–51.
156. Shah S, Eyler A, Tabandeh S, et al. Electrostatically driven self-assembled nanoparticles and coatings. In: *Nanoparticles for Biomedical Applications*. Elsevier; 2020. page 349–70.

157. Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*. 2018;10:1–64.
158. Rytting E, Ali H, Denora N, et al. Oxcarbazepine-loaded polymeric nanoparticles: development and permeability studies across in vitro models of the blood-brain barrier and human placental trophoblast. *Int. J. Nanomedicine*. 2015;10:1985–96.
159. da Silva LC, Garcia T, Mori M, et al. Preparation and characterization of polysaccharide-based nanoparticles with anticoagulant activity. *Int. J. Nanomedicine*. 2012;7:2975–86.
160. Barbosa AI, Costa Lima SA, Reis S. Development of methotrexate loaded fucoidan/chitosan nanoparticles with anti-inflammatory potential and enhanced skin permeation. *Int. J. Biol. Macromol.* 2018.
161. Rodrigues S, Costa AMR Da, Grenha A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydr. Polym.* 2012;89(1):282–9.