



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Utilização de polímeros de origem marinha na nanotecnologia farmacêutica

Joana Filipa Rolo

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de:
Professor Doutor Pedro Fonte

2023



Universidade do Algarve

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Utilização de polímeros de origem marinha na nanotecnologia farmacêutica

Joana Filipa Rolo

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho realizado sob a orientação de:
Professor Doutor Pedro Fonte

2023

Utilização de polímeros de origem marinha na nanotecnologia farmacêutica

Declaração de autoria de trabalho

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

Copyright© 2023 [Joana Filipa Rolo]

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar 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.

“Happiness can be found, even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light.”

Albus Dumbledore, Harry Potter and the Prisoner of Azkaban

Agradecimentos

O meu percurso académico na Universidade do Algarve foi, sem sombra de dúvida, uma aventura com altos e baixos, onde não posso deixar de agradecer a todas as pessoas que contribuíram para esta grande experiência.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Pedro Fonte, por ter aceite o desafio de orientar este trabalho, pela disponibilidade que demonstrou ao longo deste percurso, bem como todo o seu apoio, sugestões e críticas construtivas que, seguramente, ajudaram a tornar este trabalho melhor.

A todos os docentes do MICEF agradeço por todos os conhecimentos que me transmitiram, contribuindo para a minha formação académica, profissional e pessoal.

Uma das melhores decisões que tomei neste percurso foi ter optado por estagiar na Ilha da Madeira. À equipa do Núcleo Farmacêutico do Hospital Dr. Nélio Mendonça e da Farmácia Solanja, agradeço pela disponibilidade, partilha de conhecimentos tão importantes para o meu enriquecimento profissional, pela ajuda, simpatia e integração na equipa.

Um muito obrigado ao meu Avô, pelos valores e princípios com que me educou e por ter cuidado sempre de mim como se de uma filha me tratasse. Sem a sua ajuda, hoje eu não estaria aqui. À restante família agradeço por sempre acreditarem em mim.

Ao Dinis, não há palavras que expressem a minha gratidão. Quero agradecer pelo amor, amizade, paciência, ajuda, por acreditar sempre em mim e me incentivar a seguir os meus sonhos e ambições.

À Paula agradeço por ser uma verdadeira irmã, por estar sempre lá para mim e nunca pedir nada em troca. À minha amiga mais antiga, a Leonor, cujos anos só fortaleceram o que espero ser uma amizade para sempre, agradeço por tudo o que vivenciamos juntas. Ao Nuno e ao Chico, os meus maninhos, agradeço pela amizade, paciência (muita) e por acreditarem sempre em mim, mesmo quando eu não era capaz. À Raquel, Pimpão e Catarina A. agradeço pela amizade verdadeira e por acreditarem em mim incondicionalmente. À Inês agradeço por ter estado lá para mim quando mais precisei, pelo seu enorme apoio e por tudo o que me ensinou. Agradeço à minha “mãe de Faro” por me ter feito sentir em casa. O MICEF deu-me a conhecer a minha Juca, à qual agradeço pela amizade, apoio, confiança, conselhos e gargalhadas. Sem ela teria sido, certamente, um percurso mais difícil. Agradeço à Catarina F., Jupi e Ana Rita pela amizade, companheirismo e entajuda.

Por fim, agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação académica e pessoal.

A todos, o meu muito obrigado!

Resumo

A nanotecnologia é uma das tecnologias mais promissoras do século XXI e o seu papel é especialmente importante na administração de fármacos, solucionando alguns problemas relacionados com as formas farmacêuticas convencionais. Assim, a nanotecnologia farmacêutica possibilita a veiculação de fármacos em sistemas nanotecnológicos que, por sua vez, proporcionam a vetorização do fármaco para o local alvo do organismo, onde a sua libertação pode ocorrer de forma controlada e prolongada, promovendo então o aumento da segurança e eficácia terapêutica. Entre os vários nanossistemas, as nanopartículas poliméricas têm sido alvo de muitos estudos, uma vez que as suas propriedades físico-químicas únicas tornam estas estruturas com grande potencial para muitas aplicações na indústria farmacêutica. As nanopartículas poliméricas podem ser produzidas a partir de uma variedade de polímeros, quer de origem sintética ou de origem natural.

O ambiente marinho constitui um grande ecossistema, sendo considerado uma das maiores e mais importantes fontes de materiais naturais. De entre os biomateriais, os polímeros marinhos e os seus derivados têm sido propostos para o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos, especialmente de nanopartículas poliméricas, tirando partido do seu elevado potencial de biocompatibilidade, biodegradabilidade, reduzida toxicidade e imunogenicidade e das várias propriedades biológicas que lhe estão associadas. Os polímeros marinhos mais estudados em nanotecnologia farmacêutica são o quitosano, o ácido hialurónico, o sulfato de condroitina, a carragenina, o fucoidano, o alginato e o colagénio.

Esta dissertação teve como objetivo apresentar as potencialidades da utilização de polímeros de origem marinha em nanotecnologia farmacêutica, nomeadamente no desenvolvimento de nanopartículas poliméricas. De um modo geral, os diversos estudos apresentados demonstraram resultados bastante positivos, no que diz respeito à performance *in vitro* e *in vivo* das nanopartículas. No entanto, serão necessários estudos de toxicidade a longo prazo para avaliar a sua aplicação na prática clínica.

Palavras-chave: Nanomedicina; Administração; Nanopartícula; Polímero; Encapsulação; Libertação prolongada.

Abstract

Nanotechnology stands as one of the most promising technologies of the 21st century, playing a particularly vital role in pharmaceutical administration by addressing some issues associated with conventional pharmaceutical forms. Thus, pharmaceutical nanotechnology enables the delivery of drugs in nanotechnological systems, facilitating the targeted delivery of drugs to specific areas within the body, where its release can occur in a controlled and sustained manner, promoting increased safety and therapeutic efficacy. Among the various nanosystems, polymeric nanoparticles have garnered extensive attention due to their unique physicochemical properties, rendering them highly suitable for numerous applications within the pharmaceutical industry. These polymeric nanoparticles can be derived from a variety of polymers, whether of synthetic or natural origin.

The marine environment constitutes a vast ecosystem, widely regarded as one of the largest and most important sources of natural materials. Among biomaterials, marine polymers and their derivatives have been proposed for the development of drug delivery systems, especially polymeric nanoparticles, capitalizing on their notable attributes such as high biocompatibility, biodegradability, low toxicity, reduced immunogenicity, and various biological properties. Some of the most extensively studied marine polymers in pharmaceutical nanotechnology include chitosan, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, carrageenan, fucoidan, alginate, and collagen.

This dissertation aimed to present the potential of using polymers of marine origin in pharmaceutical nanotechnology, namely in the development of polymeric nanoparticles. In general, the various studies presented demonstrated very positive results regarding the *in vitro* and *in vivo* performance of nanoparticles. However, long-term toxicity studies will be necessary to evaluate its application in clinical practice.

Keywords: Nanomedicine; Delivery; Nanoparticle; Polymer; Encapsulation; Sustained release.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	iv
Abstract	v
Índice	vi
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	xi
Índice de quadros	xii
Lista de abreviaturas e acrónimos	xiii
1. Introdução.....	1
2. Nanotecnologia farmacêutica	3
2.1. Vantagens e desvantagens da nanotecnologia farmacêutica	5
2.2. Estratégias de administração	7
2.2.1. Administração sistémica	7
2.2.2. Vetorização	9
3. Tipos de sistemas de administração nanotecnológicos.....	12
4. Nanopartículas poliméricas	15
4.1. Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas.....	16
4.1.1. Coalescência de emulsão	16
4.1.2. Difusão do solvente na emulsão	17
4.1.3. Micelização reversa.....	18
4.1.4. Gelificação iónica e complexação polieletrólítica	19
4.1.5. Gelificação iónica modificada com polimerização radical.....	20
4.1.6. Dissolvatação	21
4.2. Revestimento da superfície de nanopartículas poliméricas.....	22
4.3. Libertação de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas	23

4.4. Polímeros utilizados na preparação de nanopartículas poliméricas.....	25
5. Polímeros de origem marinha	27
5.1. Quitosano	29
5.2. Ácido hialurónico	33
5.3. Sulfato de condroitina.....	35
5.4. Carragenina.....	37
5.5. Fucoidano.....	41
5.6. Alginato.....	43
5.7. Colagénio	45
6. Nanopartículas de polímeros de origem marinha	47
6.1. Nanopartículas de quitosano	47
6.2. Nanopartículas de ácido hialurónico	59
6.3. Nanopartículas de sulfato de condroitina	60
6.4. Nanopartículas de carragenina	61
6.5. Nanopartículas de fucoidano.....	64
6.6. Nanopartículas de alginato	69
6.7. Nanopartículas de colagénio.....	71
7. Conclusão e perspetivas futuras.....	73
Referências bibliográficas.....	75

Índice de figuras

Figura 2.1. Correlação entre as dimensões dos nanossistemas com algumas estruturas.	4
Figura 2.2. Processo de opsonização dos nanossistemas, seguido pelo reconhecimento e fagocitose por macrófagos, em contraste com a fuga dos nanossistemas ao SRE, que advém da modificação da sua superfície com o PEG.	9
Figura 2.3. Vetorização de fármacos veiculados em sistemas nanotecnológicos.	10
Figura 2.4. Captação das NP-QS e NP-QS/AH pelas células tumorais HT-29.	11
Figura 3.1. Sistemas de administração nanotecnológicos com diferentes composições, tamanhos e formas.	12
Figura 3.2. (A) Permeação cumulativa da insulina através das células Caco-2. (B) Permeação cumulativa da insulina através das células Caco-2/HT29. (C) Concentração plasmática da glicose após administração subcutânea da insulina 2,5 UI/kg; após administração oral da insulina 25 UI/kg, da insulina veiculada nas NLS não revestidas 25 UI/kg e da insulina veiculada nas NLS revestidas com quitosano 25 UI/kg.	14
Figura 4.1. Composição das nanocápsulas e das nanoesferas poliméricas.	15
Figura 4.2. Preparação de NP-QS através do método da coalescência de emulsão.	17
Figura 4.3. Preparação de NP-QS através do método da difusão do solvente na emulsão.	18
Figura 4.4. Preparação de NP-QS através do método da micelização reversa.	19
Figura 4.5. Preparação de NP-QS através do método da gelificação iónica.	20
Figura 4.6. Preparação de NP-QS através do método da gelificação iónica modificada com polimerização radical	21
Figura 4.7. Preparação de NP-QS através do método da dissolvatação.	22
Figura 4.8. Modelo proposto para a internalização celular e libertação do PTX a partir das NP-QSG/NAcHis.	25
Figura 5.1. Processo generalizado da desacetilação da quitina e estrutura química do quitosano, onde estão representadas as unidades de N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1→4).	30
Figura 5.2. Efeito do quitosano na absorção de fármacos pela via paracelular: (A) Epitélio normal; (B) Ruptura transitória das junções celulares estreitas pelo quitosano com o aumento da absorção do fármaco.	32
Figura 5.3. Estrutura química do ácido hialurónico, onde estão representadas as unidades de ácido D-glucurónico e N-acetil-D-glucosamina, ligadas entre si por ligações glicosídicas. ...	34

Figura 5.4. Estrutura química dos diferentes tipos de sulfato de condroitina (A, C, D, E), onde estão representadas as unidades de ácido glucurónico e N-acetilgalactosamina, ligadas entre si por ligações do tipo β -(1→3).	36
Figura 5.5. Estrutura química das várias formas da carragenina, onde estão representadas as unidades de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose, unidas por ligações glicosídicas.	38
Figura 5.6. Formação do gel de carragenina. As estruturas das κ - e ι -carragenina permitem que segmentos de duas moléculas formem duplas hélices, originando uma rede tridimensional. Os catiões Na^+ , K^+ e Ca^{2+} são necessários para induzir a transição de solução para um gel final.	40
Figura 5.7. Estrutura química do fucoidano isolado de algas pertencentes às ordens taxonómicas (A) Chordariales e Laminariales e (B) Fucales; (A) Unidades de L-fucose unidas por ligações do tipo α -(1→3); (B) Unidades de L-fucose ligadas por ligações alternadas do tipo α -(1→3) e α -(1→4). O R representa as posições de potenciais ligações com resíduos de carboidratos (ácido glicurónico, manose, galactose, xilose) e substituintes não carboidratos (sulfato e acetato).	42
Figura 5.8. Estrutura química do alginato exibindo as unidades α -1,4-L-gulurónico (G) e β -1,4-D-manurónico (M), organizadas em blocos.....	43
Figura 5.9. Estrutura em caixa de ovo formada pela interação entre um catião de Ca^{2+} e quatro grupos de ácido carboxílico do bloco G do alginato.....	44
Figura 5.10. Aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina na tripla hélice do colagénio.	45
Figura 6.1. Perfil de libertação da DOX a partir das NP-QS/CMQS em diferentes pH que simulam o trato gastrointestinal.	49
Figura 6.2. Níveis de glicose no sangue em ratos após a administração oral (A) e ileal (B) de NP-TMQS e NP-TMQS/Cis (50 UI/kg).....	50
Figura 6.3. Níveis de glicose plasmática em coelhos após administração nasal (pH de 7,4) de: A, NP-QS modificadas com o PEG e carregadas com insulina suspensas em PBS; B, suspensão de insulina com o quitosano modificado com o PEG em PBS; C, insulina em PBS.....	52
Figura 6.4. As concentrações de (A) IgG e (B) IgA de ratos imunizados por via intraperitoneal e intranasal nos dias 0, 14 e 28 com OVA (5 mg/kg) e toxina da cólera (2,5 g/kg) livres como controlo e veiculadas nas NP-QS.....	53
Figura 6.5. (A) Concentração de estradiol no plasma em ratos após a administração intranasal e intravenosa de NP-QS contendo estradiol na dose de 0,48 mg kg ⁻¹ . (B) Concentração de estradiol no líquido cefalorraquidiano em ratos após a administração intranasal e intravenosa de NP-QS contendo estradiol na dose de 0,48 mg kg ⁻¹	54

Figura 6.6. Fotografias de feridas diabéticas tratadas com PBS, NP-QS e curcumina livre nos dias 1, 3, 7 e 14.....	58
Figura 6.7. Níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos, após a administração oral das NP-AH contendo insulina (50 UI/kg), da solução de insulina (50 UI/kg); e a administração subcutânea da solução de insulina (1 UI/kg).....	60
Figura 6.8. Perfil de libertação in vitro da curcumina livre e da curcumina encapsulada nas NP-QS e NP-QS/SC, em PBS a pH 6,8.....	61
Figura 6.9. Atividade antioxidante da curcumina, do sulfato de condroitina, do quitosano, das NP-QS e das NP-QS/SC, medida através do método DFPH.	61
Figura 6.10. Perfil de libertação da OVA a partir das NP-QS/ κ -CRG em PBS a pH de 7,4 e a 37 °C.....	63
Figura 6.11. Viabilidade celular das linhas celulares Calu-3 e A549 medida pelo ensaio MTT, após exposição durante 24 horas a NP-QS/ κ -CRG/TPF.....	64
Figura 6.12. Perfil de libertação da curcumina a partir das NP-QS/FUC em ambientes com diferentes valores de pH, de forma a simular o trato gastrointestinal.	65
Figura 6.13. Detecção, por citometria de fluxo, da indução das células RAW 264.7 pelo lipopolissacarídeo.....	66
Figura 6.14. Número médio de MSC que migraram num ensaio de migração celular.....	67
Figura 6.15. (A) Perfil de libertação da insulina a pH 2,0, 6,8 e 7,4; (B) Efeito das NP-TMQS/FUC e NP-QS/FUC na permeação da insulina; (C) Efeito inibitório da α -glicosidase pelas NP-TMQS/FUC e NP-QS/FUC.....	68
Figura 6.16. Concentração do 5-FU in vivo obtida com uma solução de 5-FU, com as NP-QG/ALG/QS e com as nanopartículas sem revestimento.	70
Figura 6.17. Citotoxicidade da DOX livre, da DOX encapsulada nas NP-QS/ALG e nas NP-QS, em células MCF-7 após ●24, ■48, e ▲72 horas de tratamento.....	71

Índice de tabelas

Tabela 6.1. Comparação das áreas sob a curva do paciente 1 ao paciente 5, após aplicação de 0,75 mg em dose única de estradiol na forma de hidrogel contendo NP-CG ou na forma de um gel comercial (Gynokadin®).....	72
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Índice de quadros

Quadro 2.1. Vantagens e desvantagens da nanotecnologia farmacêutica.....	7
Quadro 5.1. Vantagens e desvantagens do uso de polímeros de origem marinha.	29

Lista de abreviaturas e acrónimos

3,6-AG – 3,6-anidro-D-galactose

5-FU – 5-fluorouracil

ADN – Ácido desoxirribonucleico

A/O – Água em óleo

bFGF – Fator básico de crescimento de fibroblastos

BSA – Albumina sérica bovina

DFPH - Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

DOX – Doxorrubicina

EMA – *European Medicines Agency*

ERO – Espécies reativas de oxigénio

FDA – *Food and Drug Administration*

GAG – Glicosaminoglicanos

MSC – Células-tronco mesenquimais

NaOH – Hidróxido de sódio

NLS – Nanopartículas lipídicas sólidas

NPP – Nanopartículas poliméricas

NP-AH – Nanopartículas de ácido hialurónico

NP-AH/QS – Nanopartículas de ácido hialurónico e quitosano

NP-CG – Nanopartículas de colagénio

NP-FUC – Nanopartículas de fucoidano

NP-QS – Nanopartículas de quitosano

NP-QSAC – Nanopartículas de quitosano modificado com *N*-acetil-L-cisteína

NP-QSG/NAcHis – Nanopartículas de quitosano glicol conjugado com *N*-acetil histidina

NP-QS/ALG – Nanopartículas de quitosano e alginato

NP-QS/ALG/QS – Nanopartículas de quitosano e alginato, revestidas com quitosano

NP-QS/CMQS – Nanopartículas de quitosano e o-carboximetil quitosano

NP-QS/κ-CRG – Nanopartículas de quitosano e κ-carragenina

NP-QS/κ-CRG/TPF – Nanopartículas de quitosano, κ-carragenina e tripolifosfato

NP-QS/SC – Nanopartículas de quitosano e sulfato de condroitina

NP-QS/TPF – Nanopartículas de quitosano e tripolifosfato

NP-QS/TPF/FUC – Nanopartículas de quitosano, tripolifosfato e fucoidano

NP-TMQS – Nanopartículas de trimetilquitosano

NP-TMQS/Cis – Nanopartículas de trimetilquitosano conjugado com cisteína

NP-TMQS/FUC – Nanopartículas de trimetilquitosano e fucoidano

OVA - Ovalbumina

O/A – Óleo em água

PBS – Solução fosfato salino

PEG – Polietilenoglicol

PLA - Ácido polilático

PLGA – Ácido polilático-co-glicólico

PTX - Paclitaxel

SDF-1 – Fator 1 derivado de células estromais

SNC – Sistema nervoso central

SRE – Sistema reticuloendotelial

TPF – Polianião tripolifosfato

1. Introdução

Os materiais de origem natural possuem desde sempre um papel fundamental na vida do ser humano, não só como fonte de alimento e proteção, como também na medicina tradicional, com o objetivo de tratar doenças, prolongar e melhorar a qualidade de vida (1). A área total dos oceanos corresponde a 360 milhões de quilómetros quadrados, representando cerca de 71% da área da superfície terrestre (2). Visto que a maior parte da superfície do planeta é coberta por água, o seu enorme ecossistema aquático compreende uma vasta gama de espécies, estando a maioria ainda por identificar. Vários autores reportaram a existência entre 0,7 e 1 milhão de espécies marinhas no planeta, o que exemplifica a magnitude da sua diversidade (1). Assim sendo, o ambiente marinho é considerado uma das mais importantes fontes de materiais naturais, exibindo estes uma biodiversidade extremamente diversificada e diversas propriedades biológicas (1,3).

Os fármacos não são, normalmente, administrados na sua forma livre, mas sim como parte de uma forma farmacêutica, no qual são combinados com excipientes. Estes excipientes podem funcionar como sistemas de administração inertes, ou podem deter propriedades multifuncionais, sendo estes últimos cada vez mais utilizados pela indústria farmacêutica. A indústria farmacêutica utiliza excipientes de uma ampla variedade de fontes, desde sintéticas a naturais. Entre os de origem natural, os excipientes baseados em polímeros têm sido bastante utilizados, devido às propriedades específicas que detêm, possibilitando a produção de uma série de materiais, transportadores e dispositivos. Uma das propriedades pelo qual estes polímeros são muito conhecidos consiste na sua flexibilidade estrutural, que permite a sua modificação química, de modo a cumprir requisitos específicos. Assim sendo, os polímeros de origem natural podem competir com os polímeros sintéticos já disponíveis no mercado (4).

O elevado foco da indústria farmacêutica direcionado para os polímeros de origem natural, impulsionou a exploração contínua destes compostos. Além disso, também a área biomédica está constantemente à procura de novos biomateriais com propriedades inovadoras para aplicações na engenharia de tecidos, medicina regenerativa e administração de fármacos. Os polímeros de origem natural são potenciais candidatos, não só pelas suas propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, mas também pela sua elevada disponibilidade a um custo relativamente baixo (4). Neste contexto, os polímeros de origem marinha têm sido alvo de um grande interesse, o que se deve ao aumento contínuo do conhecimento sobre as suas propriedades químicas e biológicas (3,4). Para além disso, a exploração sustentável dos recursos

marinhos, bem como a valorização dos resíduos marinhos provenientes da indústria alimentar, podem ser vantajosas do ponto de vista económico e ambiental. Como tal, diferentes organismos marinhos têm vindo a ser usados como fontes de polímeros para aplicações biomédicas, incluindo no desenvolvimento de sistemas de administração (5).

As aplicações específicas dos polímeros de origem natural em formulações farmacêuticas incluem o seu uso na produção de implantes, filmes, esferas, hidrogéis, micropartículas, nanopartículas, sistemas inaláveis e injetáveis. Nestas formas farmacêuticas, os polímeros podem ser utilizados com funções bastante diferentes (por vezes, algumas destas funções podem até ser cumulativas), como aglutinantes, materiais de revestimento, materiais de matriz, modificadores da liberação de fármacos, espessantes, estabilizantes, desagregantes, solubilizantes, emulsificantes, agentes de suspensão, agentes gelificantes e bioadesivos (4).

Devido às propriedades específicas dos polímeros de origem marinha, descritas detalhadamente ao longo da dissertação, verifica-se um particular interesse na aplicação destes polímeros no desenvolvimento de sistemas de administração, nomeadamente de nanopartículas poliméricas (NPP) (3,4). Deste modo, o objetivo da presente dissertação é apresentar uma visão aprofundada sobre as potencialidades da utilização de polímeros de origem marinha em nanotecnologia farmacêutica, especificamente no desenvolvimento de NPP.

2. Nanotecnologia farmacêutica

A origem da nanotecnologia remonta para o final da década 50, quando o físico americano Richard Feynman, vencedor do prémio Nobel da física, introduziu este conceito na famosa palestra “*There's Plenty of Room at the Bottom*”. Nesta palestra, colocou a questão “Por que não podemos escrever todos os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete?” e, nesse sentido, descreveu uma ideia visionária que se baseava na manipulação de átomos e moléculas para o fabrico de estruturas extremamente pequenas. Por este motivo, Richard Feynman é considerado o Pai da nanotecnologia. No entanto, foi apenas em 1974 que o cientista japonês Norio Taniguchi apresentou a primeira definição para nanotecnologia, definindo-a como o processo de separação, consolidação e deformação de materiais, átomo por átomo ou molécula por molécula (6). A partir do século XXI, a nanotecnologia foi alvo de um crescimento científico em diversas áreas de investigação, tornando-se uma das tecnologias mais promissoras (6,7).

A nanotecnologia é um campo multidisciplinar que utiliza conhecimentos de várias áreas, como a química, biologia, física e engenharia (8). Este campo consiste no *design*, caracterização, produção e aplicação de estruturas e sistemas, através do controlo da sua forma e tamanho à escala nanométrica (9). O prefixo “nano” tem origem na palavra grega “nano”, que significa algo pequeno. Um nanómetro (nm) corresponde a um milionésimo do metro (10^{-9} metro) e a nanotecnologia compreende sistemas de dimensões que variam no intervalo entre 1 e 100 nm (6,10,11). Contudo, em nanotecnologia farmacêutica estas dimensões são normalmente estendidas até 1000 nm (Figura 2.1) (10).

Os nanossistemas apresentam uma elevada razão entre a sua área de superfície e o volume, o que se deve às suas dimensões nanométricas (10,12). Por esta razão, estes sistemas possuem características físicas, elétricas, magnéticas e óticas únicas que os tornam interessantes para muitas aplicações, especialmente na área da saúde, visto que vários processos biológicos, mecanismos celulares e moléculas orgânicas se encontram na mesma ordem de grandeza (10,12–14).

A aplicação da nanotecnologia na área da saúde designa-se por nanomedicina e representa uma área de investigação em grande evolução. A nanomedicina refere-se à utilização de nanossistemas para o diagnóstico, tratamento, monitorização e prevenção de doenças (8,12). Além disso, a nanomedicina possibilita também uma melhor compreensão sobre a fisiopatologia das doenças (10,15). O seu objetivo consiste no diagnóstico precoce, no desenvolvimento de tratamentos não invasivos e eficazes, e na diminuição dos efeitos adversos,

tornando possível a melhoria da qualidade de vida dos doentes (8,15). As principais aplicações da nanotecnologia na saúde incluem as técnicas de imagem e ferramentas de diagnóstico, sistemas de administração de fármacos, implantes e a engenharia de tecidos (8,12). A sua aplicação pode beneficiar diversas doenças, nomeadamente as doenças cardiovasculares, o cancro, as doenças músculo-esqueléticas, as doenças neurodegenerativas, infeções e diabetes (12).

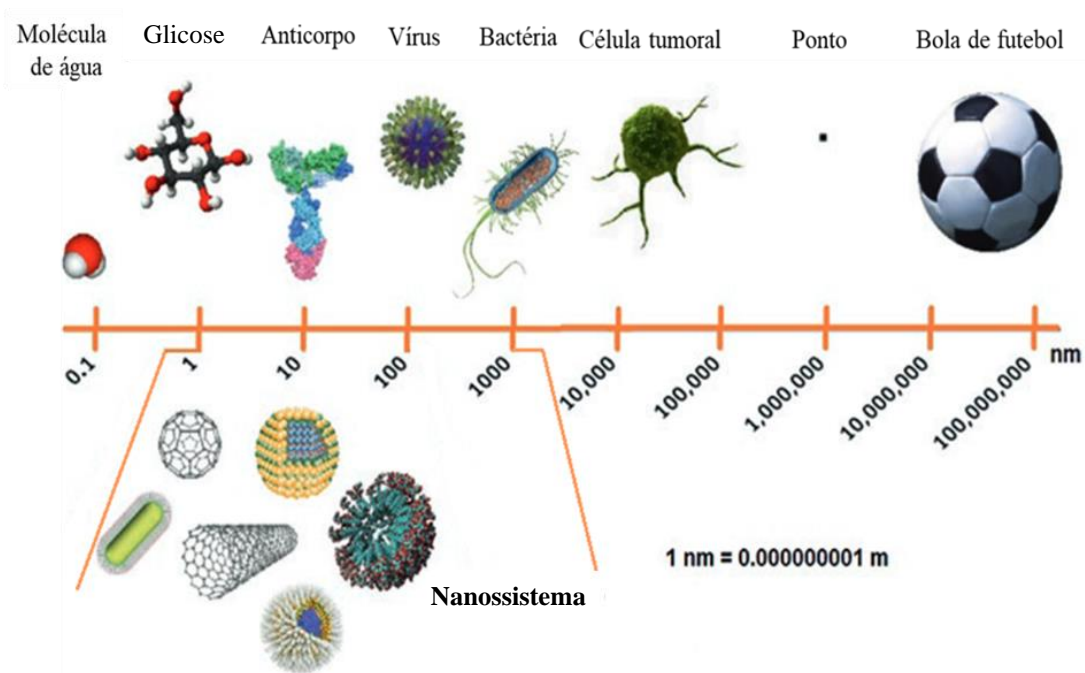


Figura 2.1. Correlação entre as dimensões dos nanossistemas com algumas estruturas. *Adaptada de (11).*

O papel da nanotecnologia é particularmente importante na administração de fármacos, uma vez que os sistemas de administração à escala nanométrica permitem solucionar alguns problemas relacionados com as formas farmacêuticas convencionais (8,10,16). Deste modo, a nanotecnologia farmacêutica possibilita a veiculação de fármacos em sistemas nanométricos que, por sua vez, proporcionam o direcionamento específico do fármaco para o local alvo do organismo, onde a libertação do fármaco pode ocorrer de forma controlada e prolongada, promovendo assim o aumento da segurança e eficácia terapêutica (8,10,16,17). Nos últimos 20 anos, o progresso da nanotecnologia farmacêutica conduziu à aprovação de 80 sistemas de administração para aplicação clínica, pela *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* (EMA). Todos os anos, novos sistemas de administração nanotecnológicos

iniciam ensaios clínicos, evidenciando a importância da nanotecnologia na administração de fármacos (16).

2.1. Vantagens e desvantagens da nanotecnologia farmacêutica

A aplicação da nanotecnologia na área farmacêutica tornou-se uma ferramenta útil para contornar algumas das limitações associadas às formas farmacêuticas convencionais, que incluem a reduzida biodisponibilidade dos fármacos, falta de especificidade para o alvo terapêutico, toxicidade sistêmica, etc (18).

Os sistemas de administração nanotecnológicos podem superar os problemas relacionados com a solubilidade e a estabilidade que afetam a biodisponibilidade de alguns fármacos pouco solúveis em água, através da sua veiculação em sistemas com propriedades hidrofílicas (19). Desta forma, o tempo de permanência do fármaco na corrente sanguínea é prolongado e, conseqüentemente, a sua concentração no local de ação irá aumentar (20).

A possibilidade de modificar o tamanho, a forma e as propriedades da superfície das nanopartículas, possibilita a vetorização de fármacos para órgãos, tecidos e células específicas (18,21). Assim sendo, estes sistemas de administração permitem que o fármaco se acumule apenas no seu local de ação, levando à melhoria da eficácia terapêutica, bem como à redução dos efeitos adversos associados (8,18,19,21). As características destes sistemas, quando adequadas, também favorecem a proteção dos fármacos veiculados contra os mecanismos de defesa endógenos, evitando a sua degradação e eliminação antes dos mesmos atingirem o alvo terapêutico. A degradação enzimática e a eliminação por parte do sistema reticuloendotelial (SRE) são alguns dos exemplos destes mecanismos (18). Além disso, devido ao tamanho reduzido dos sistemas, o seu uso permite superar outras barreiras biológicas, como é o caso da barreira hematoencefálica (8,11).

Por exemplo, o chá verde contém flavonoides como a catequina e a epigallocatequina galato, que são poderosos antioxidantes. No entanto, estes compostos são degradados na presença de fluidos intestinais e, por isso, a sua absorção através das membranas intestinais é limitada. De forma a resolver esta limitação, foi proposta a encapsulação destes compostos em nanopartículas de quitosano (NP-QS), que resultou numa melhor absorção dos mesmos no intestino (22).

Outra característica interessante nestes sistemas de administração prende-se com o facto de permitirem uma libertação prolongada, onde o fármaco se vai libertando de forma gradual,

e controlada, levando a que esta ocorra em resposta a um determinado estímulo. Este estímulo pode ser, por exemplo, a presença de enzimas específicas ou condições concretas de pH e temperatura, assegurando a função do fármaco no local de interesse e tornando possível a administração de uma menor dose de fármaco (8,18,23,24).

A elevada razão entre a área de superfície e o volume destas estruturas é responsável pela sua elevada capacidade de carga (25,26). Por esta razão, pode combinar-se no mesmo sistema diferentes fármacos, útil para patologias complexas, como o cancro, onde apenas um fármaco pode demonstrar-se ineficaz. Ainda neste contexto, podem complementar-se funções de terapêutica e diagnóstico, cuja associação adquire a denominação de teranóstico (18). Na área do teranóstico é possível monitorizar a eficácia da terapêutica, contribuindo para o desenvolvimento de uma medicina personalizada (20).

Embora os sistemas de administração nanotecnológicos possuam um papel promissor na área farmacêutica, é necessário ter em consideração as suas desvantagens, nomeadamente os seus potenciais riscos para a saúde humana (18,27). Como tal, surgiu uma nova área de investigação, a nanotoxicologia, que tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos dos nanossistemas no organismo (28). Estes efeitos devem-se essencialmente às suas dimensões reduzidas, que lhes permitem efetuar interações celulares não específicas, resultando em dano celular (27). Assim sendo, são necessários estudos para avaliar a toxicidade relacionada com estes sistemas, uma vez que os utilizados na terapêutica convencional não são adequados (19,27). Para além disso, é importante ter em conta que cada sistema é um caso e requer uma avaliação específica (27).

Algumas questões desafiantes em nanotecnologia farmacêutica compreendem o uso de processos de produção e controlo de qualidade complexos, bem como a difícil transposição da produção para uma escala industrial, pois as características físico-químicas destes sistemas podem variar nos diferentes lotes produzidos. Além disso, os custos associados às matérias-primas e ao processo de produção são muito elevados, o que pode também constituir um obstáculo ao desenvolvimento destes sistemas de administração numa escala industrial. Portanto, para justificar os custos da produção e o preço elevado no mercado, o seu benefício clínico deve superar o da terapêutica tradicional (19,27,29).

Atualmente, existem poucas orientações definidas pelas agências regulamentares para estes sistemas de administração, sendo estas importantes não só para os ensaios clínicos e procedimentos de aprovação, como também para o controlo de qualidade e caracterização destas estruturas. Por este motivo, as decisões sobre a sua utilização são baseadas na relação risco-benefício, podendo este processo de avaliação ser demorado e provocar atrasos na

comercialização. Logo, é fundamental que as agências regulamentares desenvolvam mais diretrizes normalizadas com requisitos para a aprovação de sistemas de administração nanotecnológicos, com vista à obtenção de tratamentos inovadores para os doentes (19,27,29). No quadro 2.1 é apresentado um resumo das vantagens e desvantagens da nanotecnologia farmacêutica.

Quadro 2.1. Vantagens e desvantagens da nanotecnologia farmacêutica.

Vantagens	Desvantagens
Aumento da solubilidade e estabilidade de fármacos	Interações celulares não específicas
Vetorização de fármacos para o local de ação	Processos de produção e controlo de qualidade complexos
Proteção de fármacos	Difícil transposição para escala industrial
Melhorar a permeabilidade de membranas biológicas	Elevados custos das matérias-primas e do processo de produção
Libertação controlada e/ou prolongada de fármacos	Poucas orientações definidas pelas agências regulamentares
Elevada capacidade de carga	
Aumento da eficácia terapêutica e redução dos efeitos adversos	

2.2. Estratégias de administração

2.2.1. Administração sistémica

Os sistemas de administração nanotecnológicos podem ser administrados por diferentes vias, como a via oral, nasal, pulmonar, parenteral, entre outras (30). De uma forma geral, após os nanossistemas atingirem a circulação sistémica, estes precisam de ultrapassar as diferentes barreiras biológicas que existem para proteger o organismo de partículas estranhas. Alguns exemplos específicos destas barreiras são: a rápida depuração renal por filtração glomerular; a eliminação pelo SRE; a parede dos vasos sanguíneos, que impede o acesso direto aos órgãos e tecidos; e a membrana celular, quando é necessário ocorrer internalização dentro da célula, para que o fármaco exerça a sua ação (31).

As propriedades físico-químicas dos sistemas nanotecnológicos, como o tamanho, a forma e as propriedades da superfície, influenciam o seu percurso no organismo. Neste sentido, o tamanho dos nanossistemas condiciona o seu tempo na circulação sanguínea, uma vez que esta propriedade influencia diretamente a área de superfície em contacto com os sistemas

biológicos (32). Os nanossistemas devem permanecer em circulação sanguínea durante um período suficiente que lhes permita cumprir o seu objetivo. Contudo, os sistemas com dimensões inferiores a 10 nm são rapidamente eliminados por filtração glomerular nos rins. Por outro lado, os sistemas com dimensões superiores a 200 nm podem ser alvo de opsonização, sendo capturados pelas células fagocitárias do SRE (33). Também a forma dos nanossistemas determina o seu percurso no organismo. Estes podem assumir formas esféricas e não esféricas. Embora o formato esférico seja o mais estudado, o formato não esférico é menos propenso à remoção pelo SRE, persistindo na circulação sanguínea durante mais tempo. Além disso, o formato não esférico possui um melhor efeito de marginação, que é essencial para a adesão dos sistemas à parede dos vasos sanguíneos, possibilitando a sua saída da corrente sanguínea em direção aos locais alvo (32).

A carga superficial pode afetar também o destino destes sistemas no organismo. Os nanossistemas com carga superficial positiva exibem uma elevada afinidade com as membranas celulares que apresentam carga negativa. Contudo, sistemas com carga superficial positiva podem ser mais facilmente removidos da corrente sanguínea pelo SRE. Por outro lado, os sistemas com carga superficial negativa exibem um tempo em circulação sanguínea prolongado, mas a sua absorção celular é reduzida, o que pode diminuir a eficácia terapêutica (34). O caráter hidrofóbico dos nanossistemas influencia o processo de opsonização e, conseqüentemente, a sua distribuição no organismo. Os sistemas hidrofóbicos tendem a adsorver mais proteínas plasmáticas (também conhecidas por opsoninas) à sua superfície sendo, por isso, mais facilmente eliminados da circulação sanguínea pelo SRE. Uma abordagem promissora para reduzir a depuração pelo SRE consiste na introdução de polímeros hidrofílicos à superfície dos nanossistemas, como o polietilenoglicol (PEG) (Figura 2.2). O PEG é um polímero inerte e possui a capacidade de mascarar o caráter hidrofóbico e a carga superficial dos sistemas nanotecnológicos (32).

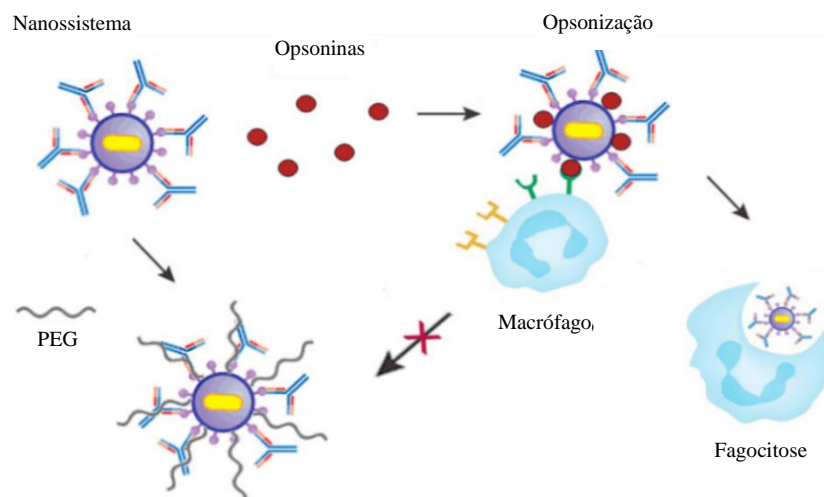


Figura 2.2. Processo de opsonização dos nanossistemas, seguido pelo reconhecimento e fagocitose por macrófagos, em contraste com a fuga dos nanossistemas ao SRE, que advém da modificação da sua superfície com o PEG. *Adaptada de (35).*

2.2.2. Vetorização

A vetorização baseia-se no aumento da especificidade dos sistemas de administração para a célula ou tecido alvo, através da funcionalização da sua superfície com determinados ligandos (Figura 2.3) (8). Estes têm a capacidade de reconhecer e se ligar com elevada afinidade e especificidade a determinados recetores celulares, que são expressos em maior quantidade na superfície das células alvo (8,36). Assim sendo, é possível distinguir estas células e as células saudáveis circundantes, reduzindo os efeitos tóxicos provocados nestas últimas (8,37).

A interação que ocorre entre os ligandos de superfície e os recetores presentes na superfície das células de interesse, desencadeia a internalização dos sistemas de administração no interior da célula, através de endocitose mediada por recetores e, conseqüentemente, favorece o aumento da concentração do fármaco no interior da mesma (8,37).

Os ligandos de superfície mais utilizados incluem os anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, ácidos nucleicos, açúcares, vitaminas, peptídeos, aptâmeros e outras pequenas moléculas (8). Relativamente aos recetores celulares, alguns exemplos específicos são o recetor da transferrina, recetor do folato, recetor do fator de crescimento epidémico e glicoproteínas da superfície celular (37).

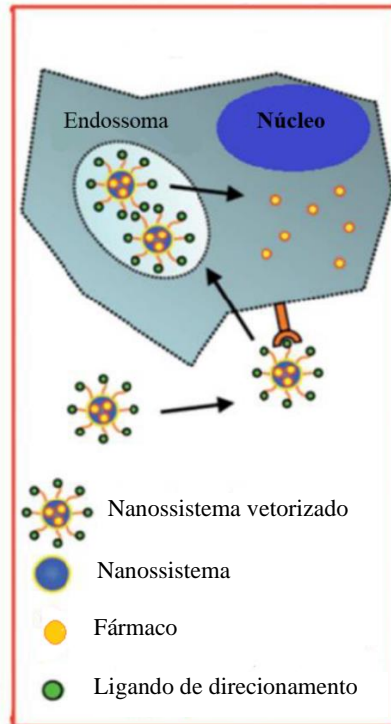


Figura 2.3. Vetorização de fármacos veiculados em sistemas nanotecnológicos. *Adaptado de* (8).

Por exemplo, os recetores CD44 do ácido hialurónico encontram-se em maior quantidade na superfície das células tumorais. O uso de ácido hialurónico no direcionamento de NP-QS foi estudado por um grupo de trabalho para a administração de 5-fluorouracil (5-FU) como terapêutica no cancro colorretal. As NP-QS com ácido hialurónico acoplado à sua superfície demonstraram uma captação celular significativamente maior pelas células tumorais HT-29, em comparação com as NP-QS sem ácido hialurónico acoplado, o que indica claramente que a captação das nanopartículas ocorreu através dos recetores CD44 das células tumorais (Figura 2.4) (38).

Ainda no mesmo âmbito, outro estudo utilizou um anticorpo monoclonal, o trastuzumab, como molécula de direcionamento de NP-QS carregadas com o fármaco antitumoral, a doxorubicina (DOX). O trastuzumab foi conjugado à superfície das nanopartículas e os resultados demonstraram uma captação celular seletiva pelas células tumorais Her2⁺, em comparação com as nanopartículas não revestidas e com a DOX livre. Assim, uma vez que as nanopartículas revestidas pelo anticorpo permitem a distinção entre as células Her2⁺ e Her2⁻, estas têm potencial para ser utilizadas na administração direcionada de fármacos, diminuindo os efeitos adversos associados à terapêutica antitumoral (39).

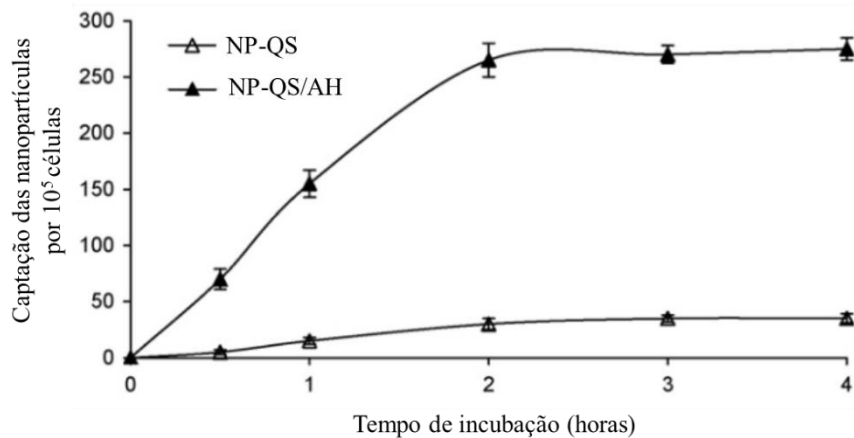


Figura 2.4. Captação das NP-QS e NP-QS/AH pelas células tumorais HT-29. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n = 4$). NP-QS/AH, nanopartículas de quitosano com ácido hialurônico acoplado à superfície. *Adaptado de (38).*

A escolha da molécula de direcionamento constitui o grande desafio na estratégia de vetorização, visto que esta se deve ligar de forma exclusiva aos recetores das células desejadas, para que seja possível evitar um efeito prejudicial nas células saudáveis (8). Além disso, os recetores celulares selecionados devem existir de forma homogênea em todas as células alvo (40).

3. Tipos de sistemas de administração nanotecnológicos

Existe uma variedade de sistemas de administração nanotecnológicos utilizados na área farmacêutica com diferentes tamanhos, formas, composições e funcionalidades, como se observa na Figura 3.1. Cada tipo de sistema pode ainda ser preparado utilizando diferentes métodos (41). Os sistemas de administração nanotecnológicos podem ser distinguidos em “duros” e “moles”, de acordo com o material usado na sua síntese (8).

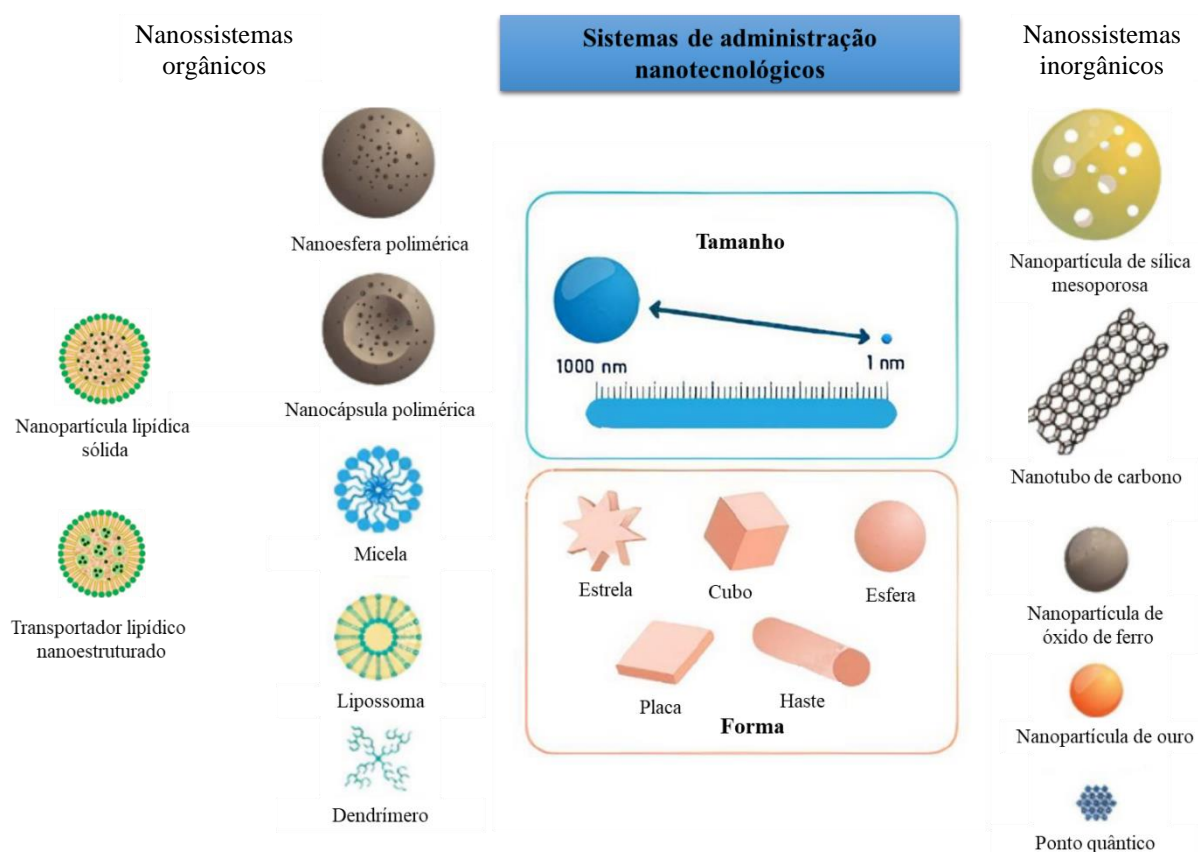


Figura 3.1. Sistemas de administração nanotecnológicos com diferentes composições, tamanhos e formas. Adaptada de (8,42).

Os sistemas “duros” são constituídos por materiais inorgânicos e incluem estruturas como nanopartículas de sílica mesoporosa, nanotubos de carbono, nanopartículas de óxido de ferro, nanopartículas de ouro e pontos quânticos (8,43,44). Devido à sua composição em materiais inorgânicos, a estabilidade coloidal e o potencial efeito tóxico dos sistemas no organismo devem ser fatores a ter em consideração. Por este motivo, a sua superfície é frequentemente modificada com materiais biocompatíveis, melhorando a segurança e eficácia da sua aplicação (8).

Por outro lado, os sistemas de administração considerados “moles” são compostos por materiais orgânicos à base de carbono, entre os quais fazem parte as nanopartículas lipídicas, lipossomas, dendrímeros e as NPP (8,43,44). Estes sistemas caracterizam-se pela sua biocompatibilidade. Além disso, possuem uma maior capacidade de carga, o que lhes permite transportar uma grande diversidade de fármacos (43). Também a sua superfície pode ser modificada com moléculas hidrofílicas, que melhoram a estabilidade de substâncias pouco solúveis em água ou tornam os sistemas menos reconhecíveis por macrófagos do SRE (8).

Para além dos nanossistemas mencionados, é possível combinar num sistema materiais com composições químicas diferentes, como polímeros e lípidos, de modo a tirar partido das suas propriedades. Estes tipos de sistemas são designados por nanopartículas híbridas (28,45). Uma característica muito importante do polímero quitosano, refere-se à sua capacidade de revestir outros materiais, como lípidos, melhorando as propriedades dos sistemas de administração previamente formados e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica dos fármacos encapsulados (24,46). Assim, um grupo de investigação produziu nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para a administração oral da insulina. O revestimento das NLS com quitosano conferiu carga positiva ao sistema, permitindo uma melhor interação com as membranas celulares que apresentam carga negativa. Como tal, as NLS revestidas com quitosano apresentaram uma melhor permeação da insulina através de um modelo de células Caco-2 em monocamada, comparativamente às NLS não revestidas (Figura 3.2A). Um comportamento semelhante foi observado utilizando um modelo de células Caco-2 e HT29 em monocamada, que melhor se assemelhava à membrana intestinal, demonstrando que as propriedades mucoadesivas do quitosano aumentaram a permeação da insulina (Figura 3.2B). Após a administração oral das nanopartículas a ratos diabéticos, observou-se um efeito hipoglicémico pronunciado após 24 horas, que foi mais evidente quando foram administradas NLS revestidos com quitosano (Figura 3.2C). Além disso, verificou-se a internalização nos enterócitos da insulina veiculada nas NLS revestidas com quitosano, mostrando a capacidade dos sistemas para aumentar a captação intestinal da insulina (47).

A presente dissertação foca-se nas NPP desenvolvidas a partir de polímeros de origem marinha, pelo que nas próximas secções as suas características, vantagens e aplicações serão abordadas com maior detalhe.

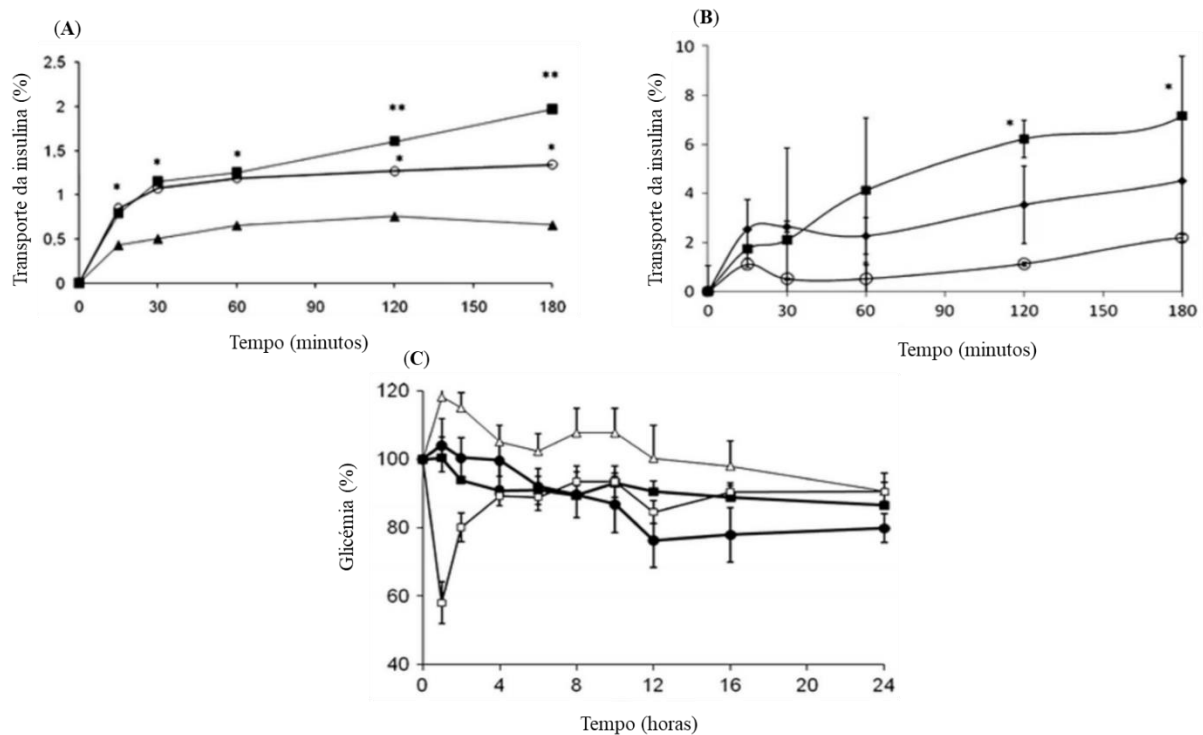


Figura 3.2. (A) Permeação cumulativa da insulina através das células Caco-2. Os círculos representam a insulina veiculada nas NLS não revestidas; os quadrados representam a insulina veiculada nas NLS revestidas com quitosano; os triângulos representam a insulina livre. * $p < 0,05$, NLS não revestidas e NLS revestidas com quitosano são estatisticamente diferentes da insulina livre. ** $p < 0,05$, NLS revestidas com quitosano são estatisticamente diferentes das NLS não revestidas; (B) Permeação cumulativa da insulina através das células Caco-2/HT29. Os losangos representam a insulina veiculada nas NLS não revestidas; os quadrados representam a insulina veiculada nas NLS revestidas com quitosano; os círculos representam a insulina livre. * p , NLS revestidas com quitosano são estatisticamente diferentes da insulina livre. (C) Concentração plasmática da glicose após administração subcutânea da insulina 2,5 UI/kg (quadrados vazios); após administração oral da insulina 25 UI/kg (triângulos), da insulina veiculada nas NLS não revestidas 25 UI/kg (quadrados preenchidos) e da insulina veiculada nas NLS revestidas com quitosano 25 UI/kg (círculos) ($n = 6$). Adaptado de (47).

4. Nanopartículas poliméricas

Em nanotecnologia farmacêutica, as NPP são partículas sólidas, produzidas a partir de polímeros de origem natural ou sintética (48,49). De acordo com a sua composição e o método usado na sua preparação, podem classificar-se em nanocápsulas e nanoesferas (50). As nanocápsulas são constituídas por um reservatório interno, oleoso ou aquoso, no qual o fármaco está geralmente dissolvido, e uma membrana polimérica envolvente, onde o fármaco pode também ficar adsorvido. Por outro lado, as nanoesferas são compostas por uma matriz polimérica sólida e contínua, na qual o fármaco pode ficar uniformemente disperso, bem como adsorvido à superfície (48,50,51). As nanocápsulas e as nanoesferas funcionam como um sistema do tipo reservatório e um sistema do tipo matricial, respetivamente (51). Uma representação esquemática dos dois tipos de NPP é apresentada na Figura 4.1.

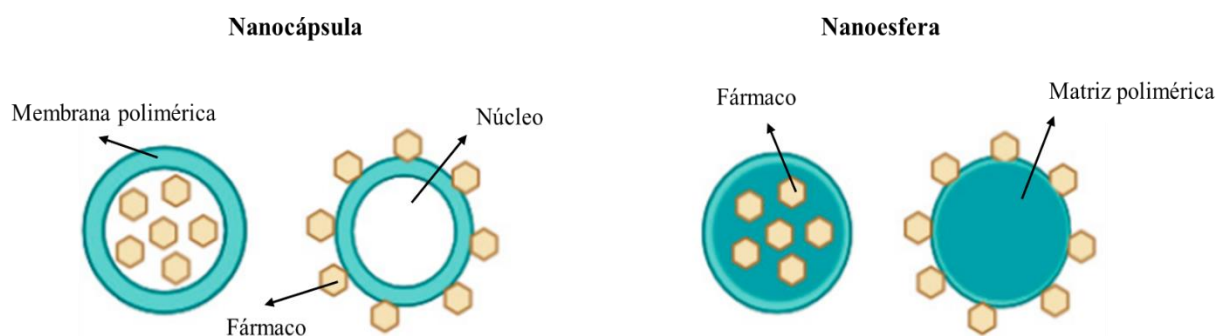


Figura 4.1. Composição das nanocápsulas e das nanoesferas poliméricas. *Adaptada de (51).*

De um modo geral, os fármacos suscetíveis à degradação enzimática que pode ocorrer no ambiente biológico, devem ser encapsulados nas NPP para a sua proteção. Neste caso, a associação do fármaco com as NPP deve ocorrer durante a preparação das nanocápsulas ou nanoesferas. Pelo contrário, quando o fármaco pode sofrer degradação durante o processo de preparação, este deve ser adsorvido na superfície das NPP já preparadas (52).

As NPP têm sido alvo de muitos estudos, uma vez que as suas propriedades físico-químicas únicas tornam estas estruturas com grande potencial para muitas aplicações, nomeadamente na indústria farmacêutica (50,53). Em comparação com outros sistemas nanotecnológicos, as NPP funcionam como ótimos veículos para a administração de fármacos, visto que exibem algumas características vantajosas para esse efeito: elevada eficiência na encapsulação de fármacos, alta estabilidade nos fluídos biológicos e biocompatibilidade com tecidos e células, quando são utilizados polímeros biocompatíveis na sua preparação (18,49,53). Outras características peculiares das NPP referem-se à possibilidade de modificar as

propriedades da sua superfície e à sua capacidade de controlar a libertação de fármacos em locais específicos (4,49). É importante ressaltar que o interesse nestas estruturas é também atribuído à disponibilidade de uma ampla gama de polímeros (49). A administração das NPP pode realizar-se pela maioria das vias de administração, o que torna também a sua aplicação na área farmacêutica muito vantajosa (4,53). Diversos métodos têm sido desenvolvidos para a produção de NPP, sendo alguns deles descritos na secção seguinte.

4.1. Métodos de preparação de nanopartículas poliméricas

O quitosano é um dos polímeros marinhos mais utilizados no desenvolvimento de sistemas de administração, pelo que será utilizado como polímero modelo no que diz respeito aos métodos de preparação de NPP (54). A preparação de NP-QS foi descrita pela primeira vez em 1994 por Ohya e os seus colaboradores (55). Neste estudo pioneiro, as NP-QS foram obtidas através da aplicação de uma técnica de emulsificação, com uma etapa posterior de reticulação com glutaraldeído. Embora se tenha verificado a viabilidade da síntese de NP-QS estáveis com capacidade de encapsulação de fármacos, os efeitos prejudiciais atribuídos ao glutaraldeído impulsionaram o desenvolvimento de diferentes tecnologias para a produção de nanopartículas baseadas neste polímero (24).

Atualmente, diferentes métodos têm sido utilizados para a preparação de NP-QS (46). Todos os métodos que serão abordados compreendem processos de produção *bottom-up*, visto que envolvem a montagem das moléculas em solução para formar estruturas definidas, que neste caso correspondem às NPP (56,57). É importante ressaltar que a escolha do método a aplicar depende das especificidades e requisitos associados a cada aplicação, nomeadamente as propriedades físico-químicas e a estabilidade do fármaco, perfil cinético de libertação pretendido, biodistribuição, eficiência da absorção celular, destino intracelular das nanopartículas, entre outros (54). De um modo geral, os métodos mais utilizados para a preparação de NP-QS são a gelificação iónica e a complexação de polieletrólitos (46).

4.1.1. Coalescência de emulsão

Este método foi aplicado pela primeira vez na preparação de micropartículas, sendo mais tarde adaptado à preparação de NP-QS (58,59). Neste método, o quitosano é dissolvido numa solução aquosa com o fármaco e uma pequena alíquota desta solução é adicionada a uma solução de parafina líquida, contendo sesquiolato de sorbitano (Span[®] 83) (Figura 4.2). Esta

mistura é agitada utilizando um homogeneizador de alta velocidade, formando assim uma emulsão do tipo água em óleo (A/O). Simultaneamente, outra emulsão do tipo A/O é preparada, através da adição de hidróxido de sódio (NaOH) a uma fase externa semelhante. Ambas as emulsões são então misturadas através de um homogeneizador de alta velocidade, levando à coalescência das gotículas. Este processo resulta na solidificação das partículas de quitosano devido à ação do NaOH, que atua como agente precipitante. Posteriormente, um conjunto adicional de etapas de lavagem e centrifugação é aplicado às NP-QS (58).

Neste método tira-se partido de que, quando duas emulsões com fase externa igual são misturadas, as gotículas de cada uma colidem aleatoriamente e coalescem, resultando em gotículas finais com um conteúdo uniforme (56).

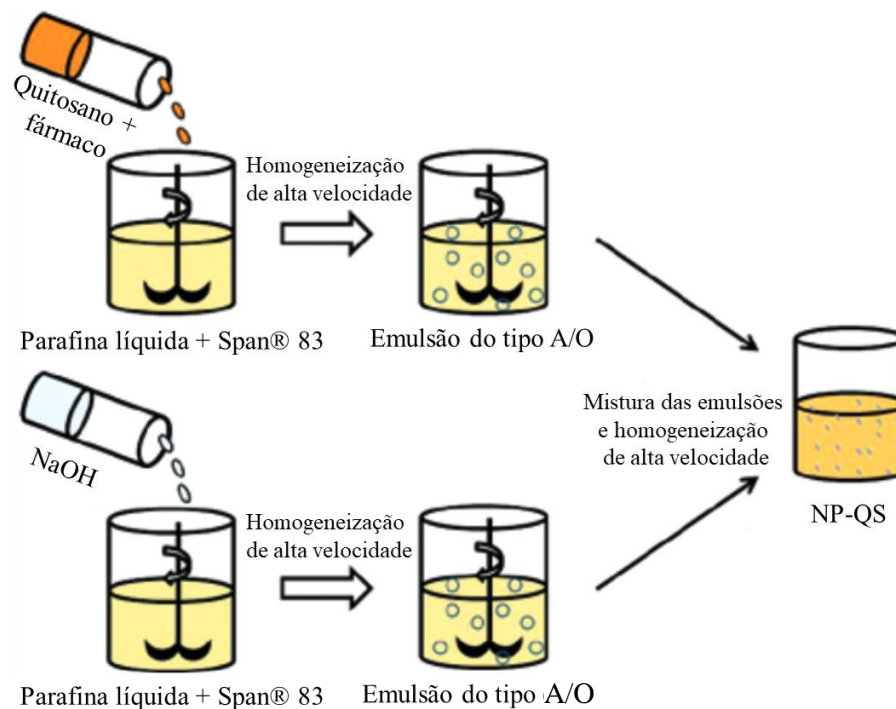


Figura 4.2. Preparação de NP-QS através do método da coalescência de emulsão. *Adaptada de (56).*

4.1.2. Difusão do solvente na emulsão

O método da difusão do solvente na emulsão baseia-se na miscibilidade parcial de um solvente orgânico com água e envolve a adição de uma fase orgânica (constituída, por exemplo, por cloreto de metileno e acetona), contendo o fármaco hidrofóbico, numa solução aquosa, composta pelo quitosano e um estabilizante (por exemplo, o poloxâmero), sob agitação (Figura

4.3) (56,60). Isto origina a formação de uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) que é, posteriormente, submetida a uma homogeneização de alta pressão. O cloreto de metileno é, subsequentemente, removido sob pressão reduzida e à temperatura ambiente. Nesta fase, a acetona difunde-se pela fase aquosa, o que faz diminuir a solubilidade do quitosano e, assim, levar à formação das nanopartículas por precipitação do polímero. No final do processo, as nanopartículas são isoladas por centrifugação (56).

Embora este método tenha capacidade para produzir veículos eficientes, é importante destacar a sua necessidade em recorrer a condições severas de preparação, como o uso de solventes orgânicos e a aplicação de altas forças de cisalhamento, fatores estes que estão ausentes noutros métodos (56).

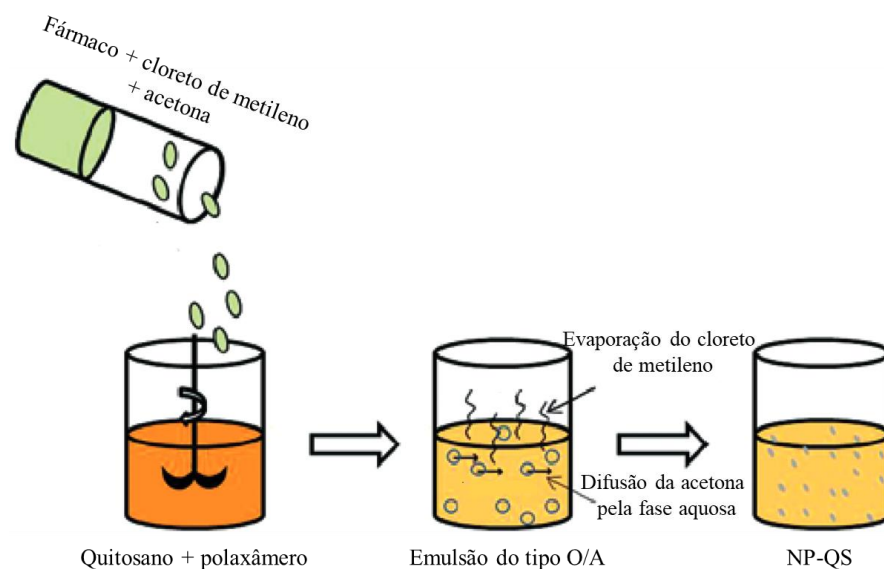


Figura 4.3. Preparação de NP-QS através do método da difusão do solvente na emulsão. *Adaptada de (56).*

4.1.3. Micelização reversa

O método da micelização reversa consiste na preparação de uma emulsão do tipo A/O, no qual é utilizado um surfactante lipofílico dissolvido num solvente orgânico apropriado, como o *n*-hexano. Alguns dos surfactantes utilizados neste método são o bis-(2-etil-hexil) sulfosuccinato de sódio e o brometo cetiltrimetilamónio. A fase aquosa que contém o quitosano, o fármaco e o glutaraldeído, é adicionada à fase orgânica sob agitação contínua. Conforme representado na Figura 4.4, são então produzidas micelas reversas. Após evaporação do solvente, efetua-se a extração das nanopartículas (61,62).

Comparado com outros métodos baseados numa emulsão, o método da micelização reversa tem como vantagem a produção de nanopartículas com um tamanho de cerca de 100 nm ou menor. No entanto, este método apresenta algumas desvantagens, como o difícil isolamento das nanopartículas e a necessidade de maior quantidade de solvente orgânico (56).

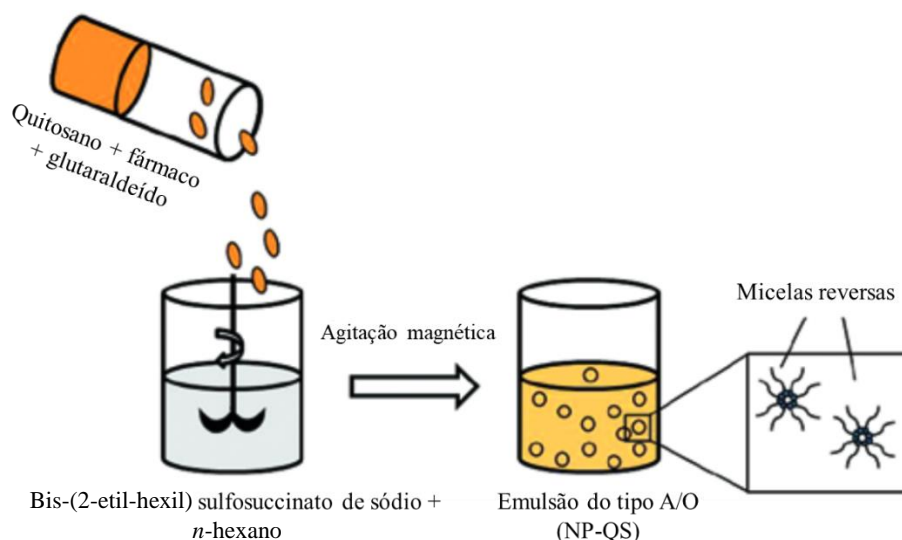


Figura 4.4. Preparação de NP-QS através do método da micelização reversa. *Adaptada de (56).*

4.1.4. Gelificação iónica e complexação polieletrólítica

O método da gelificação iónica do quitosano baseia-se na interação entre os grupos amina, de carga positiva, presentes na estrutura molecular do quitosano, e o polianião tripolifosfato (TPF), que atua como reticulador do quitosano (63). Neste método, as NP-QS formam-se após a adição da solução de TPF na solução de quitosano, sob agitação leve e à temperatura ambiente (Figura 4.5). Depois de aproximadamente 10 minutos de agitação, a suspensão de nanopartículas é centrifugada, o sobrenadante descartado e o *pellet* constituído pelas nanopartículas é ressuspenso em água. A gelificação iónica ocorre sempre que a gelificação do quitosano é induzida por uma complexação com pequenas moléculas aniónicas, como fosfatos, citratos, sulfatos, entre outros (64).

Quando macromoléculas de carga negativa são utilizadas no lugar de pequenas moléculas, o processo designa-se por complexação polieletrólítica (64). Os materiais aplicados na produção de nanopartículas através deste método, incluem vários polímeros, como o sulfato de dextrano (65), o alginato de sódio (66), a carragenina (67), o ácido poliacrílico (68), goma

arábica (69), ácido poli- γ -glutâmico (70,71), e também substâncias à base de proteínas, como a insulina (72) ou mesmo o ácido desoxirribonucleico (ADN) (73).

Estas técnicas apresentam vantagens importantes, entre as quais se destacam as condições de preparação, que envolvem apenas agitação suave e um ambiente completamente hidrofílico. De facto, devido à ausência de solventes orgânicos ou altas forças de cisalhamento, é possível encapsular fármacos lábeis como proteínas e, possivelmente por este motivo, estes métodos têm sido os mais aplicados na produção de NP-QS (24).

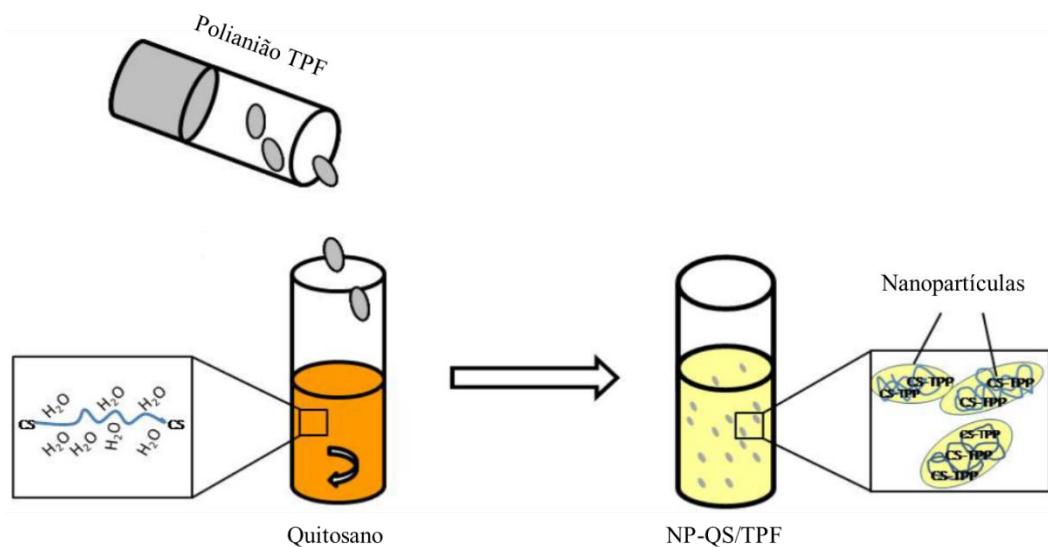


Figura 4.5. Preparação de NP-QS através do método da gelificação iônica. *Adaptada de (56).*

4.1.5. Gelificação iônica modificada com polimerização radical

Este método envolve a modificação do método da gelificação iônica descrito acima, uma vez que neste caso a gelificação do quitosano ocorre em simultâneo com a polimerização de monómeros do ácido acrílico. De forma resumida, uma solução aquosa com monómeros de ácido acrílico ou metacrílico é misturada, sob agitação e à temperatura ambiente, com uma solução aquosa de quitosano. Conforme representado na Figura 4.6, as cargas opostas do quitosano e do ácido acrílico permitem uma interação iônica entre ambos, levando à gelificação do quitosano. Em simultâneo, a polimerização radical é iniciada pela adição de persulfato de potássio e esta reação ocorre durante aproximadamente 6 horas a uma temperatura que pode variar entre 60 e 70°C. De forma a remover os monómeros residuais que não reagiram, são

realizadas lavagens subsequentes das partículas com água destilada ou é utilizado um procedimento de diálise (68,74,75).

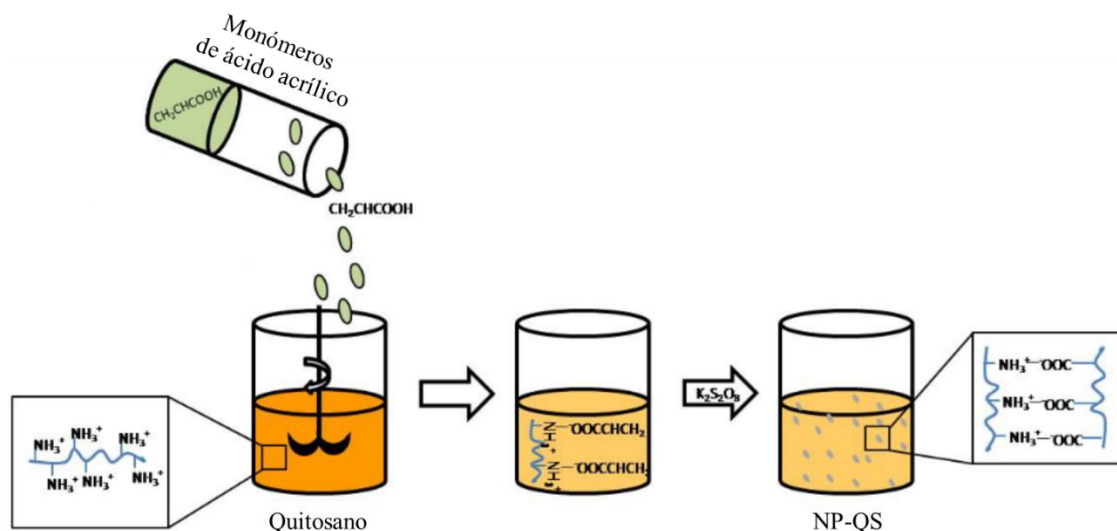


Figura 4.6. Preparação de NP-QS através do método da gelificação iônica modificada com polimerização radical. *Adaptada de (56).*

4.1.6. Dissolvatação

O processo de dissolvatação consiste na agregação macromolecular provocada pela dissolvatação parcial de moléculas totalmente solvatadas (24). O uso de agentes dissolventes foi descrito pela primeira vez para a preparação de micropartículas (76). Contudo, atualmente, este procedimento é também aplicado para produzir NP-QS (24). Têm sido propostos como agentes precipitantes substâncias como o sulfato de sódio e não solventes miscíveis em água (como a acetona, etanol e isopropanol), sendo os primeiros os mais utilizados para o efeito. A formação de NP-QS através deste método envolve a adição gota a gota de um agente dissolvente numa solução de quitosano (Figura 4.7). Quando este é adicionado à solução de quitosano, induz a eliminação da água de solvatação disposta ao redor do quitosano, uma vez que possui maior afinidade pela água, levando à insolubilização do polímero e à sua consequente precipitação. Isto, por sua vez, provoca um aumento das interações entre as moléculas de quitosano, formando as nanopartículas. A solução de quitosano geralmente contém um estabilizante, como o polissorbato 80, para estabilizar a suspensão das nanopartículas formadas. Um processo subsequente de reticulação, por exemplo com glutaraldeído, foi descrito na literatura, a fim de endurecer as nanopartículas (24).

Essa técnica apresenta diversas vantagens em relação a outros métodos, sendo a mais importante a sua capacidade de produzir nanopartículas numa etapa única, além de seu custo e consumo de energia elétrica baixos (46).

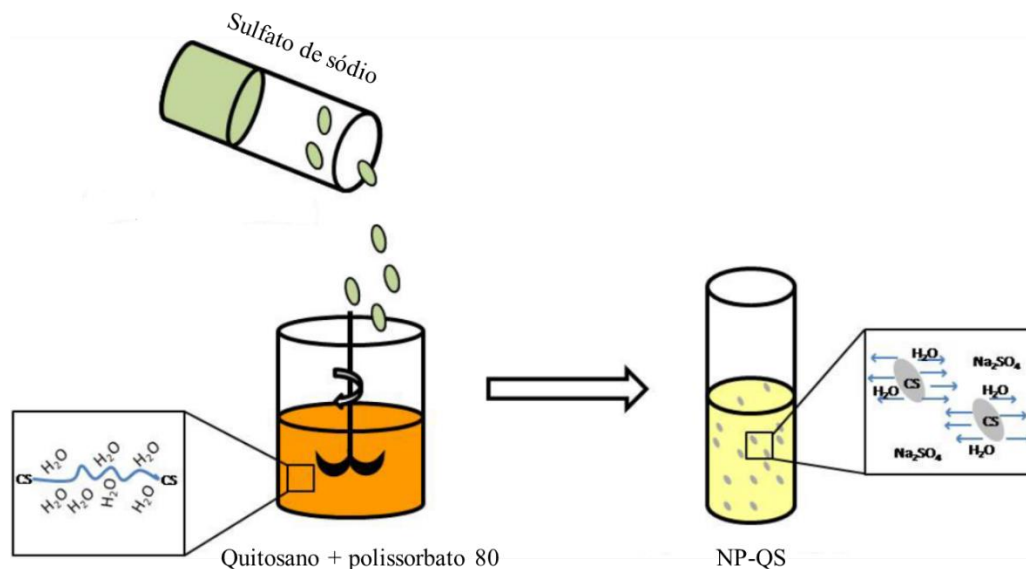


Figura 4.7. Preparação de NP-QS através do método da dissolvatação. *Adaptada de (56).*

4.2. Revestimento da superfície de nanopartículas poliméricas

As propriedades da superfície dos sistemas de administração influenciam a sua estabilidade e desempenho no organismo, uma vez que afetam a sua interação com o sistema imunológico e o tecido de interesse. A superfície das NPP pode ser sujeita a modificações, através da conjugação com polímeros hidrofílicos e ligandos de reconhecimento molecular, de forma a alcançar as propriedades desejadas. Esta conjugação pode ocorrer através de ligações covalentes ou não covalentes (77).

O PEG é o polímero hidrofílico mais utilizado no revestimento das NPP, pois este polímero cria uma barreira estérica que constitui um obstáculo ao processo de opsonização, ou seja, à adsorção de proteínas plasmáticas, impedindo assim a sua captura pelas células fagocitárias do SRE (35,77). Deste modo, o revestimento com o polímero PEG permite aumentar o tempo de permanência das NPP na circulação sanguínea, proporcionando, em consequência, o aumento da sua concentração no tecido alvo. Para além do PEG, mais polímeros hidrofílicos têm sido empregues, com o mesmo objetivo, no revestimento das NPP. Estes polímeros podem ter origem sintética, entre os quais são exemplo a polivinilpirrolidona

e o álcool polivinílico, ou origem natural, como o dextrano, o quitosano e o ácido hialurónico (77).

Um grupo de investigação, com o objetivo de obter um tempo em circulação sanguínea prolongado, preparou nanopartículas de ácido polilático (PLA) revestidas com PEG e quitosano. O PEG e o quitosano inibiram a captação das nanopartículas pelos macrófagos e prolongaram o seu tempo na corrente sanguínea. Com base nestes resultados, o efeito furtivo conferido pelo PEG e o quitosano pode ser promissor no desenvolvimento de sistemas de administração de longa circulação (78).

4.3. Libertação de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas

As formas farmacêuticas convencionais são conhecidas por provocar, logo após a administração, a libertação da maior parte do fármaco, originando um pico na concentração sistémica do mesmo, e de seguida uma diminuição acentuada da sua concentração no organismo. Por outro lado, a libertação de fármacos de forma controlada visa o controlo temporal e espacial da concentração do fármaco no organismo, promovendo a eficácia clínica da administração do fármaco e reduzindo os seus efeitos adversos. Deste modo, a aplicação de NPP baseadas em materiais biodegradáveis na administração de fármacos constitui uma estratégia bastante promissora para este mecanismo de libertação controlada (79).

A biodegradação do polímero e a libertação do fármaco são fatores fundamentais a ter em consideração durante o desenvolvimento das NPP (80). O mecanismo clássico da libertação controlada de fármacos consiste na regulação da taxa de biodegradação do polímero e da difusão do fármaco (50). Neste sentido, a libertação de fármacos a partir de NPP pode ocorrer através: (a) da dessorção do fármaco ligado/adsorvido à superfície das NPP; (b) da difusão do fármaco através da matriz polimérica; (c) da difusão do fármaco através da membrana polimérica; (d) da erosão da matriz polimérica; (e) e de um processo combinado entre a erosão e a difusão. Como tal, o perfil de libertação de fármacos depende da natureza das NPP. No caso das nanoesferas, o fármaco encontra-se uniformemente distribuído pela matriz polimérica e a sua libertação pode ocorrer por difusão ou erosão da matriz. Se a libertação do fármaco acontecer de forma mais rápida do que a degradação da matriz polimérica, então a libertação do fármaco é atribuída, principalmente, ao processo de difusão. A libertação rápida que acontece após a administração destes sistemas, deve-se à fração de fármaco adsorvida ou fracamente ligada à superfície das NPP (81,82). Relativamente à libertação do fármaco a partir

das nanocápsulas, esta acontece por difusão do mesmo desde o núcleo até à membrana polimérica e, de seguida, através desta (81).

O uso de NPP que respondem a estímulos representa uma abordagem recente na administração de fármacos. Estes novos sistemas de administração possibilitam um tempo em circulação sanguínea mais longo, o direcionamento do fármaco para o local de interesse, uma maior libertação intracelular do fármaco e a libertação controlada do mesmo, tanto no espaço como no tempo (79). Como tal, na presença de um estímulo intracelular ou extracelular, de origem química, bioquímica ou física, é desencadeada uma modificação estrutural ou química nas NPP, promovendo, deste modo, a libertação do fármaco num ambiente biológico específico (79,83). As fontes de estímulo podem ser internas, devido a uma alteração do pH, do potencial de redução, da força iónica e à presença de determinadas enzimas; podem ser externas, através da ativação de uma fonte de energia como a luz, o calor, um campo magnético ou elétrico e ultrassom; ou ainda uma combinação de ambas as fontes (18,79,83). A título de exemplo, o ambiente extracelular dos tecidos tumorais caracteriza-se por um pH relativamente ácido, entre 6,2 e 6,9, quando comparado com o pH dos tecidos saudáveis e o pH do sangue, de 7,4. Além disso, também os compartimentos intracelulares (endossomas e lisossomas) exibem um pH ácido, entre 4,0 e 6,0 (83). Assim, as NPP podem ser desenvolvidas a partir de polímeros sensíveis ao pH, que em resposta à alteração do pH ambiental, possibilitam a desestabilização da estrutura polimérica, com a consequente libertação do fármaco encapsulado (79,83).

Neste contexto, Park *et al.* sintetizaram nanopartículas baseadas no derivado do quitosano, o quitosano glicol, conjugado com o grupo *N*-acetil histidina (NP-QSG/NAcHis), formando um sistema promissor para a administração intracitoplasmática do paclitaxel (PTX). A captação celular deste sistema ocorreu por endocitose iniciada por interações inespecíficas com as membranas celulares (Figura 4.8A). Entretanto, algumas NP-QSG/NAcHis foram alvo de exocitose e outras ficaram localizadas nos endossomas (Figura 4.8B e 4.8C). No ambiente ácido característico dos endossomas, as NP-QSG/NAcHis carregadas com o PTX sofreram desestabilização devido à protonação do grupo imidazol da histidina. Este grupo protonado interagiu com as bicamadas lipídicas carregadas negativamente e induziu o influxo de água e iões nos endossomas, causando também a desestabilização destas estruturas, proporcionando a libertação do PTX no citoplasma e, conseqüentemente, a indução da paragem do crescimento celular (Figura 4.8D) (84).

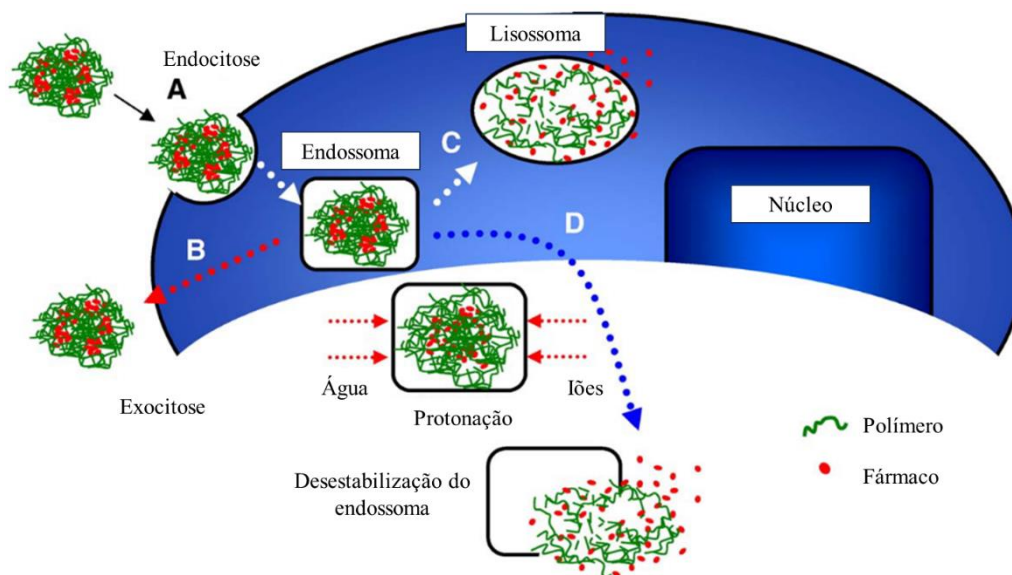


Figura 4.8. Modelo proposto para a internalização celular e liberação do PTX a partir das NP-QSG/NAcHis. (A) A internalização das NP-QSG/NAcHis é iniciada por interações inespecíficas com as membranas celulares; (B) Uma parte das NP-QSG/NAcHis é alvo de exocitose; (C) As NP-QSG/NAcHis que não têm um mecanismo específico para escapar aos endossomas são dirigidas para os lisossomas e sofrem degradação enzimática; (D) No ambiente levemente ácido dos endossomas, o grupo imidazol da histidina é protonado, causando a ruptura das membranas endossomais e a liberação simultânea do PTX no citoplasma. *Adaptado de* (84).

4.4. Polímeros utilizados na preparação de nanopartículas poliméricas

Os polímeros são macromoléculas formadas por subunidades repetidas, designadas de monómeros, ligadas entre si por ligações covalentes (85,86). No processo de seleção dos materiais a utilizar na preparação de NPP, alguns requisitos fundamentais devem ser cumpridos, como a biodegradabilidade, biocompatibilidade, versatilidade e reduzidos custos associados à sua produção (87). Assim, a degradação dos polímeros utilizados com este fim, deve ocorrer no organismo e os seus metabolitos eliminados através das vias metabólicas normais (50,88). Além disso, estes polímeros, assim como os seus produtos de degradação, devem ser biocompatíveis e não provocar efeitos tóxicos e imunogénicos no corpo humano (52,88).

Os polímeros naturais destacam-se pela sua maior biocompatibilidade, biodegradabilidade, reduzida toxicidade e pela sua elevada disponibilidade na natureza, o que os torna atrativos para aplicações farmacêuticas (49,87,89). De facto, uma das estratégias para evitar a potencial toxicidade dos sistemas de administração consiste na aplicação de materiais naturais. Além disso, estes polímeros detêm algumas vantagens comparativamente aos de origem sintética, nomeadamente uma melhor capacidade de adesão celular, propriedades

mecânicas similares aos tecidos do organismo e uma maior versatilidade. A versatilidade dos polímeros naturais permite que as suas propriedades sejam, de forma fácil, adaptadas a uma aplicação específica (87). Os polímeros naturais podem ser baseados em proteínas e polissacarídeos, com origem em animais, plantas, bactérias e fungos. Alguns dos polímeros naturais mais estudados para a administração de fármacos são o quitosano, o dextrano, a heparina, o ácido hialurónico, o colagénio, a albumina e a gelatina (51,79,88). As variações que se verificam entre os diferentes lotes produzidos de NPP baseadas em polímeros naturais constitui uma desvantagem à aplicação destes materiais (50,90). No entanto, os polímeros naturais cumprem mais facilmente os requisitos acima mencionados, pelo que o benefício da sua aplicação na administração de fármacos supera esta limitação (87,90).

Por outro lado, a preparação de NPP baseadas em polímeros sintéticos pode ser controlada de maneira a possibilitar uma menor variação entre os lotes produzidos, facilitando a transposição da sua produção para uma escala industrial (91). Os polímeros sintéticos mais usados na preparação de NPP são o PLA, o ácido poliglicólico e o copolímero ácido polilático-co-glicólico (PLGA) (51,79,88,89). Contudo, os produtos de degradação deste tipo de polímeros podem apresentar propriedades tóxicas e causar reações imunogénicas no organismo (91). Por exemplo, o PLGA, embora seja bastante utilizado, aumenta a acidez local devido à sua degradação, podendo causar irritação no local onde é utilizado (92). Deste modo, o principal problema na aplicação de polímeros de origem sintética na administração de fármacos relaciona-se com a sua falta de biocompatibilidade (91).

5. Polímeros de origem marinha

O ambiente marinho e a sua ampla diversidade de organismos oferecem uma enorme fonte de materiais naturais com potenciais usos na área farmacêutica, cosmética, biomédica e alimentar (1,4). De entre os biomateriais, os polímeros marinhos são moléculas orgânicas grandes que cumprem diversas funções estruturais ou biológicas nos organismos. Um excelente exemplo de polímeros marinhos são os polissacarídeos, constituídos por longas cadeias de unidades de açúcar unidas por ligações glicosídicas, que apresentam estruturas e funções biológicas diferentes. Os organismos marinhos, tais como os crustáceos, cnidários e diversas espécies de peixes, bem como as algas, são importantes fontes de polissacarídeos. Outro exemplo de polímeros marinhos são as proteínas, que compreendem moléculas orgânicas complexas, sendo encontradas em abundância nos animais. As proteínas e os peptídeos marinhos podem ser extraídos de diversos organismos marinhos, onde se incluem os peixes, mariscos, algas, crustáceos, moluscos, equinodermos e esponjas. Também dependendo das suas estruturas e sequências de aminoácidos, estes polímeros podem exibir uma ampla gama de funções biológicas (93). Contudo, o foco da indústria farmacêutica tem sido colocado nos polissacarídeos marinhos (1).

Os polímeros marinhos e os seus derivados têm sido propostos para o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos, nomeadamente de nanopartículas, tirando partido do seu elevado potencial de biocompatibilidade, biodegradabilidade, reduzida toxicidade e imunogenicidade (1,3,87,94). Por exemplo, os produtos de degradação das NPP baseadas em polissacarídeos marinhos correspondem a pequenas unidades de açúcar, que são facilmente eliminadas do organismo pelos processos metabólicos convencionais (87).

Além disso, os polímeros marinhos caracterizam-se por uma estrutura flexível, linear ou ramificada, que permite a realização de modificações químicas, devido à presença de um grande número de grupos funcionais nessa estrutura (grupos hidroxilo, amina e carboxilo) (87,95). Esta característica pode ser benéfica para vários métodos de preparação de NPP e para o desenvolvimento de sistemas direcionados para o local de interesse (87). O interesse nestes polímeros prende-se também com as suas propriedades adesivas, que permitem a aderência a superfícies biológicas, visto que o uso das NPP implica, normalmente, uma interação com as superfícies celulares (3,87). Assim, os grupos funcionais reativos dos polímeros permitem a formação de ligações não covalentes com as superfícies celulares, proporcionando uma maior absorção do fármaco. Adicionalmente, as propriedades hidrofílicas destes materiais são de

particular importância, pois permitem a produção de NPP com recurso a métodos que evitam solventes orgânicos (87).

A sua aplicação em terapia genética é também benéfica, uma vez que esta área é limitada pelo potencial tóxico associado aos materiais virais. Assim sendo, a utilização de polímeros marinhos como veículos de material genético, como também de outros agentes terapêuticos, garante a sua estabilidade, proteção e, promove ainda, a sua libertação controlada (3).

Outras vantagens relacionadas ao uso de polímeros de origem marinha são a ausência do risco de transmissão zoonótica e o facto de evitarem questões éticas relacionadas com mamíferos (2). Além disso, estes polímeros possuem uma maior incidência de bioatividade, biodiversidade e inovação química, quando comparados com os que são isolados de fontes terrestres (1).

É importante ressaltar que os polímeros de origem marinha são económicos, uma vez que existem em grande abundância na natureza, estão prontamente disponíveis e exibem processos de extração e purificação relativamente simples (1,87). Como tal, todas estas propriedades, juntamente com as possíveis funções biológicas dos polímeros, contribuirão para a sua maior aplicação na produção de sistemas de administração de fármacos, particularmente de NPP (87).

Todavia, embora a relevância das vantagens acima mencionadas, algumas desvantagens devem ser tidas em consideração, como a possibilidade da sua aplicação causar uma resposta imunogénica no organismo. Outro desafio refere-se às diferenças estruturais que existem entre os polímeros de acordo com a sua origem e fornecedor (87,95). A difícil reprodução do microambiente marinho em laboratório resulta ainda numa elevada percentagem de diversidade marinha pouco estudada (1). No quadro 5.1 encontra-se um resumo das vantagens e desvantagens da aplicação dos polímeros de origem marinha em nanotecnologia farmacêutica.

Nas próximas secções, as características dos polímeros de origem marinha mais estudados em nanotecnologia farmacêutica serão detalhadas.

Quadro 5.1. Vantagens e desvantagens do uso de polímeros de origem marinha.

Vantagens	Desvantagens
Biocompatibilidade e biodegradabilidade	Possível resposta imunogénica
Reduzida toxicidade e imunogenicidade	Variabilidade entre lotes
Estrutura flexível e facilidade em realizar modificações químicas	Complexidade e várias estruturas químicas
Capacidade bioadesiva	Elevada diversidade marinha ainda por estudar
Propriedades hidrofílicas	
Terapia genética	
Sem risco de transmissão zoonótica	
Ausência de questões éticas	
Atividade biológica e inovação química	
Elevada biodiversidade	
Abundância na natureza e custos económicos reduzidos	
Processos de extração e purificação simples	

5.1. Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo de origem natural, obtido por desacetilação parcial da quitina (54,96). Por sua vez, a quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, logo a seguir à celulose (46). A quitina é um componente estrutural que se encontra maioritariamente no exoesqueleto de crustáceos e insetos, bem como na parede celular de alguns fungos (54,97). A maior fonte da quitina é proveniente dos resíduos gerados pelo processamento dos alimentos extraídos do mar (isto é, a casca dos caranguejos, camarões e lagostins) (98). Assim, torna-se possível converter estes resíduos em compostos de interesse para possíveis aplicações biomédicas e, ao mesmo tempo, resolver o problema da poluição relacionado com o processamento de alimentos do mar (1). Contudo, a quitina, por ser bastante hidrofóbica, é insolúvel em água, na maioria dos solventes orgânicos comuns e é ainda quimicamente inerte não sendo, portanto, utilizada em aplicações farmacêuticas (54,98,99).

O processo de desacetilação da quitina consiste na remoção de grupos acetilo sendo, frequentemente, realizado com uma solução concentrada de NaOH (30-50%) a uma temperatura bastante elevada (100-150°C) (98). Este processo conduz à síntese do quitosano que na sua estrutura molecular fica com grupos funcionais amina (98,100). A Figura 5.1 representa o processo de desacetilação da quitina. O quitosano é um polissacarídeo de estrutura

linear, constituído por unidades repetidas, distribuídas alternadamente, de *N*-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4) (Figura 5.1) (54,101). As proporções entre estas duas unidades na estrutura polimérica determinam o grau de desacetilação do polímero, ou seja, a extensão da reação de desacetilação da quitina (97). De uma forma geral, o termo quitosano é utilizado quando a extensão de desacetilação é superior a 50% e, por outro lado, o termo quitina é referido quando esta extensão é insignificante ou inferior a 20% (96).

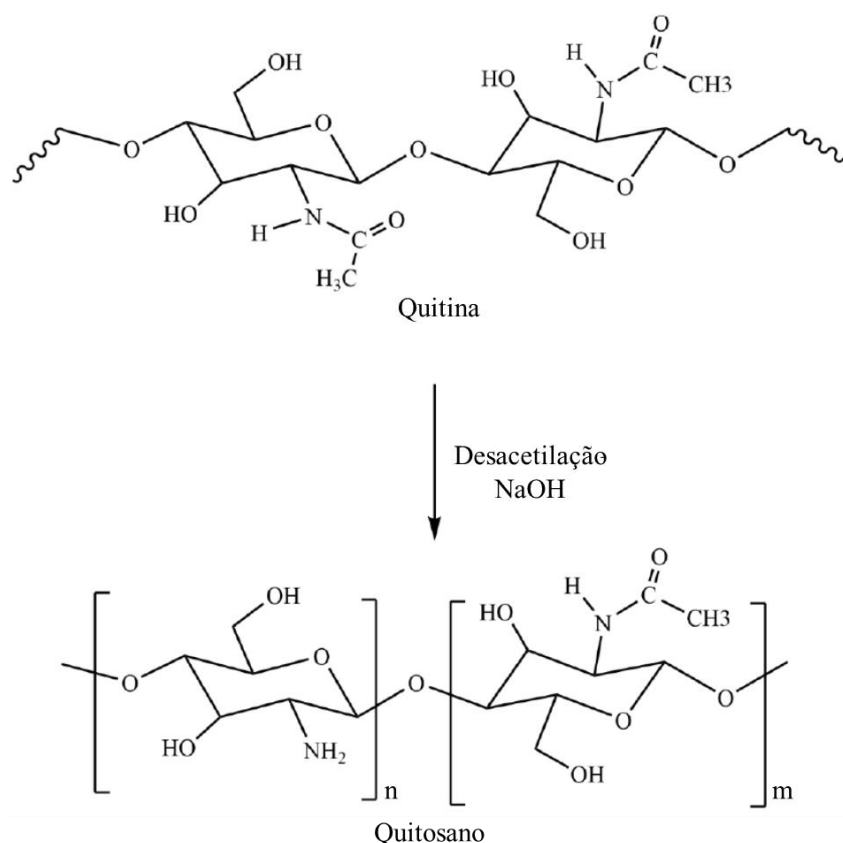


Figura 5.1. Processo generalizado da desacetilação da quitina e estrutura química do quitosano, onde estão representadas as unidades de *N*-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina, ligadas por ligações glicosídicas do tipo β -(1 \rightarrow 4). Adaptada de (102).

O quitosano encontra-se disponível numa variedade de formas que diferem no seu peso molecular e grau de desacetilação e determinam, conseqüentemente, o comportamento deste polímero (99,101). O quitosano comercial apresenta um peso molecular médio entre 3800 e 2000000 Dalton (Da), bem como um grau de desacetilação que pode variar entre 66 e 95% (100). O grau de desacetilação do quitosano exibe uma importante influência sobre várias características, entre as quais a solubilidade, biodegradabilidade, toxicidade, atividade antimicrobiana, entre outras (54).

Relativamente à solubilidade do quitosano, este é insolúvel em água, soluções aquosas alcalinas e nos solventes orgânicos comuns (103). No entanto, uma vez que os grupos amina presentes na estrutura polimérica detêm uma constante de dissociação ácida de aproximadamente 6,5, o quitosano torna-se solúvel em soluções aquosas ácidas diluídas (com pH inferior a 6,5), como o ácido acético e o ácido fórmico (54,98,101). Isto acontece devido à protonação dos grupos amina presentes na cadeia polimérica na sua forma solúvel (54,99). Portanto, em ambiente ácido, o grupo amina confere um carácter catiónico ao quitosano (46,97). O grau de desacetilação do quitosano influencia a sua solubilidade, sendo que os polímeros com maior grau de desacetilação são mais facilmente solúveis em soluções aquosas ácidas (99). Também o peso molecular exerce um efeito fundamental sobre as propriedades do quitosano. Geralmente, as moléculas de baixo peso molecular e menor grau de desacetilação apresentam maior solubilidade e uma degradação mais rápida, comparativamente às suas contrapartes de alto peso molecular (97).

Devido ao elevado peso molecular e à estrutura linear do quitosano, este polímero comporta-se como um excelente agente intensificador da viscosidade em ambiente ácido. Além disso, a viscosidade de uma solução de quitosano também pode ser influenciada pela temperatura, força iónica e pH da solução. Uma molécula de quitosano com reduzido peso molecular contribui para uma solução menos viscosa. Neste sentido, a viscosidade de uma solução de quitosano é diretamente proporcional à concentração e ao grau de desacetilação do mesmo. Pelo contrário, é inversamente proporcional ao pH e à temperatura da solução (100).

O interesse neste polímero deve-se também à sua versatilidade, pois contém grupos funcionais na estrutura molecular, como os grupos amina e hidroxilo (96,101). Esta característica possibilita a realização de modificações químicas, levando à síntese de um vasto leque de derivados do quitosano com diferentes especificidades, para serem utilizados em várias aplicações nas áreas da biomedicina, biotecnologia e farmacêutica (96,98,101). Estas modificações proporcionam o melhoramento de algumas propriedades do quitosano (sem afetar o seu carácter catiónico), como a solubilidade e mucoadesão, e permitem a aquisição de novas atividades biológicas para aplicações específicas, bem como o direcionamento para determinadas células alvo (24,46,96,103).

O quitosano é um polímero conhecido pelas suas propriedades biológicas únicas e excepcionais (96). Um aspeto bastante vantajoso associado à utilização deste polímero diz respeito à sua capacidade de aderir às superfícies mucosas, permitindo um maior tempo de contacto entre os fármacos e estas superfícies, aumentando, desta forma, a absorção dos compostos sem afinidade com o muco (46,101). Esta adesão do quitosano às mucosas deve-se

à interação eletrostática que ocorre entre os grupos amina, que apresentam carga positiva, e os resíduos do muco, nomeadamente os grupos de ácido siálico da mucina, carregados negativamente (98,100,101). O grau de desacetilação do quitosano exibe também um importante impacto nas suas propriedades de mucoadesão. Neste sentido, a mucoadesividade aumenta com o aumento da desacetilação do quitosano, visto que existe uma maior densidade de carga positiva proveniente dos grupos amina, que estão disponíveis para interação com os componentes do muco. Isto explica o motivo pelo qual a maioria das aplicações farmacêuticas do quitosano são realizadas com polímeros altamente desacetilados, pois estes são responsáveis por um tempo de retenção prolongado no local de ação ou absorção (99,101).

Outra propriedade muito relevante no quitosano, particularmente para a sua aplicação no desenvolvimento de sistemas de administração, consiste na sua capacidade de promover a permeação de macromoléculas através da abertura transitória das junções estreitas entre as células dos epitélios bem organizados, como o nasal, intestinal, ocular, bucal e pulmonar (Figura 5.2) (101). Este mecanismo ocorre devido à interação entre os grupos amina do quitosano e as membranas celulares que, conseqüentemente, causa a reorganização estrutural das proteínas das junções celulares estreitas (96). Além disso, o quitosano possui ainda várias atividades biológicas muito benéficas para o seu uso clínico, como a atividade analgésica, antitumoral, antioxidante, antimicrobiana, homeostática e exibe também um efeito hipocolesterolémico (46,96).

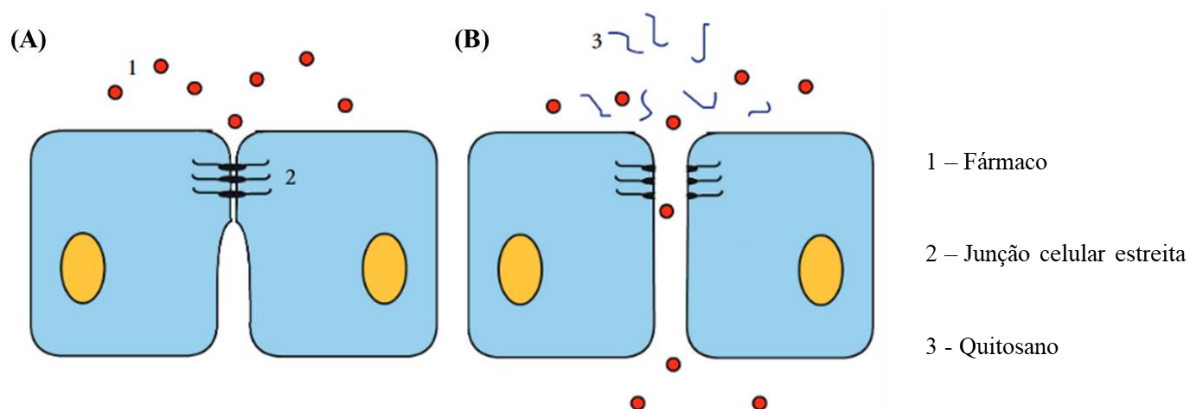


Figura 5.2. Efeito do quitosano na absorção de fármacos pela via paracelular: (A) Epitélio normal; (B) Rutura transitória das junções celulares estreitas pelo quitosano com o aumento da absorção do fármaco. Adaptada de (104).

A biodegradabilidade e a biocompatibilidade do quitosano são propriedades especialmente importantes, sobretudo no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos. É de salientar que, em condições fisiológicas, as bioenzimas, como são exemplo a

lisozima e a quitinase, podem catalisar a despolimerização deste polissacarídeo (46,101). Estas enzimas localizam-se nas superfícies mucosas e na flora intestinal, respetivamente. Os produtos de degradação do quitosano não são prejudiciais para o corpo humano, uma vez que são oligossacarídeos e podem ser incorporados nas vias metabólicas dos glicosaminoglicanos (GAG) e glicoproteínas, ou facilmente eliminados do organismo através da urina. No entanto, se ocorrer uma degradação muito rápida do quitosano, esta poderá resultar numa acumulação de aminoaçúcares, induzindo uma resposta inflamatória e, portanto, afetando a biocompatibilidade deste polímero no corpo humano (101).

O quitosano possui características estruturais semelhantes às apresentadas pelos GAG, que constituem um importante componente dos tecidos conjuntivos. Por este motivo, este polímero tem sido estudado para diversas aplicações biomédicas, como a cicatrização de feridas, engenharia de tecidos, odontologia e ortopedia. Além disso, o quitosano tem a capacidade de se fixar e impedir a absorção da gordura sendo, por isso, incluído em suplementos dietéticos comercializados com o objetivo de induzir perda de peso (99). Este polissacarídeo tem sido imensamente utilizado no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos, como soluções, hidrogéis, micropartículas e nanopartículas (96). O potencial deste polímero é enorme e continuará a aumentar à medida que novas aplicações para o mesmo são investigadas (98).

5.2. Ácido hialurónico

Os GAG são polissacarídeos de estrutura linear, formados por unidades de dissacarídeos ligadas por ligações covalentes. Estes polissacarídeos encontram-se geralmente ligados covalentemente a uma proteína central, de modo a formar um proteoglicano com diferentes funções biológicas. Os GAG incluem o ácido hialurónico, o sulfato de condroitina, a heparina/sulfato de heparina, o sulfato de dermatano e o sulfato de queratano. As suas principais diferenças são o comprimento da cadeia polimérica, a sua ligação com a proteína central, o grau de sulfatação, entre outras (2,105). De entre os GAG referidos, o ácido hialurónico e o sulfato de condroitina são dois importantes polímeros naturais, com aplicações na área biomédica, cosmética, alimentar e farmacêutica (2).

O ácido hialurónico, também designado por hialuronano, constitui um componente importante da matriz extracelular e encontra-se no cordão umbilical, na pele, no líquido sinovial, no humor vítreo e no tecido cartilaginoso (3,93,106). As fontes marinhas têm sido

investigadas para a procura deste polímero, podendo este ser isolado do fígado da raia, de moluscos bivalves, peixes cartilagosos e do humor vítreo de diversas espécies de peixes, evitando assim os riscos patogénicos dos animais terrestres (93).

Relativamente à sua estrutura, o ácido hialurónico é um polissacarídeo aniónico de estrutura linear, formado por unidades repetidas de dissacarídeos de ácido D-glucurónico e *N*-acetil-D-glucosamina, ligadas entre si por ligações glicosídicas alternadas do tipo β -(1→4) e β -(1→3) (Figura 5.3) (3,93). Ao contrário de outros GAG, este polissacarídeo não apresenta grupos sulfato na sua constituição e não se encontra ligado a uma proteína central, não formando, por isso, um proteoglicano (105). O seu peso molecular pode variar entre 2×10^5 e 10^7 KDa, apresentando um tamanho superior aos restantes GAG e tornando-o uma das maiores moléculas existentes no corpo humano (105,107). O ácido hialurónico é também uma molécula versátil que pode ser modificada de diversas formas, tornando-o adequado para aplicações específicas (107). A sua biodegradação é assegurada pela ação de enzimas hidrolases, como a hialuronidase, que quebra a ligação glicosídica entre os as unidades do polímero (3).

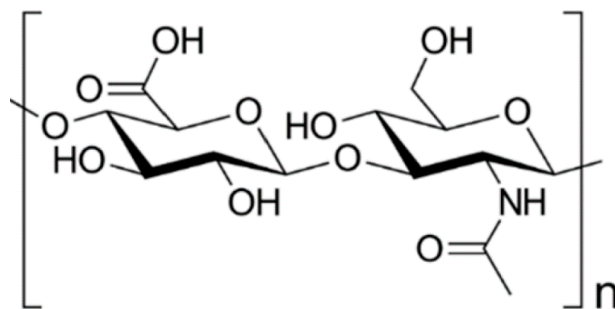


Figura 5.3. Estrutura química do ácido hialurónico, onde estão representadas as unidades de ácido D-glucurónico e *N*-acetil-D-glucosamina, ligadas entre si por ligações glicosídicas. *Adaptada* de (93).

O ácido hialurónico desempenha um papel relevante em muitas funções biológicas, tais como a cicatrização de feridas, reparação tecidual e lubrificação das articulações (3,107). Neste contexto, este polímero pode absorver e reter uma elevada quantidade de moléculas de água, tornando-o um excelente agente hidratante e um componente essencial na manutenção da hidratação e lubrificação dos tecidos. Devido à sua capacidade de retenção de água, este polímero exibe um comportamento viscoelástico único, permitindo o amortecimento e absorção dos choques nas articulações e outros tecidos. Além disso, o ácido hialurónico apresenta um papel importante na matriz extracelular, pois contribui para a sua integridade estrutural. Também a sua interação com as células desempenha um papel significativo em vários processos biológicos. O ácido hialurónico pode interagir com recetores presentes na superfície das células,

como o CD44, controlando a adesão, proliferação, diferenciação e migração celular. Adicionalmente, possibilita a regulação de processos fisiológicos como a inflamação e a resposta imunitária (2,107). As funções biológicas deste polímero dependem do seu tamanho, pelo que diferentes pesos moleculares do polímero podem estar associados a efeitos fisiológicos e aplicações específicas no organismo (107,108). Por exemplo, um polímero de maior peso molecular está associado a uma ação anti-inflamatória, enquanto um menor peso molecular pode contribuir para o desenvolvimento de um processo inflamatório (107).

Assim sendo, em consequência das suas propriedades físico-químicas e funções biológicas, o ácido hialurónico tem sido utilizado em injeções articulares, cirurgias oculares, tratamento da osteoartrite, cirurgias plásticas e tratamentos da pele (como grandes queimaduras e produtos de antienvhecimento) (105,108). Para além disso, este polímero é amplamente utilizado em aplicações biomédicas, como o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos (3,93).

5.3. Sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina é um polissacarídeo pertencente à classe dos GAG (109). Este polímero é também um dos principais constituintes da matriz extracelular de vários tecidos, nomeadamente a cartilagem, ossos, pele, tendões e ligamentos (110). A sua extração é geralmente efetuada a partir da cartilagem de bovinos e suínos, podendo também ser realizada a partir de alguns animais marinhos, como a baleia e o tubarão. Contudo, por motivos ecológicos, o uso de espécies protegidas para a extração deste polímero é, atualmente, bastante limitado. Não obstante, existem outras fontes de extração a partir de animais marinhos não mamíferos, como a raia, o salmão, o atum, o pepino-do-mar, alguns cnidários e moluscos (3,111).

Este polímero é um polissacarídeo linear constituído por unidades repetidas de dissacarídeos de ácido glucurónico e *N*-acetilgalactosamina, ligadas entre si por ligações do tipo β -(1→3), e pode ser sulfatado em diferentes posições e quantidades (3,110,112). Como é possível observar na Figura 5.4, de acordo com a posição dos grupos sulfato na cadeia molecular, este pode ser identificado com letras diferentes: A, C, D e E (113). A composição do polímero depende da fonte de onde o mesmo é isolado. Por exemplo, o sulfato de condroitina do tipo A é normalmente isolado da cartilagem bovina e suína, enquanto o do tipo C é geralmente extraído do tubarão. Deste modo, os polímeros disponíveis no mercado não

apresentam estruturas homogêneas, o que se reflete em diferentes atividades biológicas (109,113).

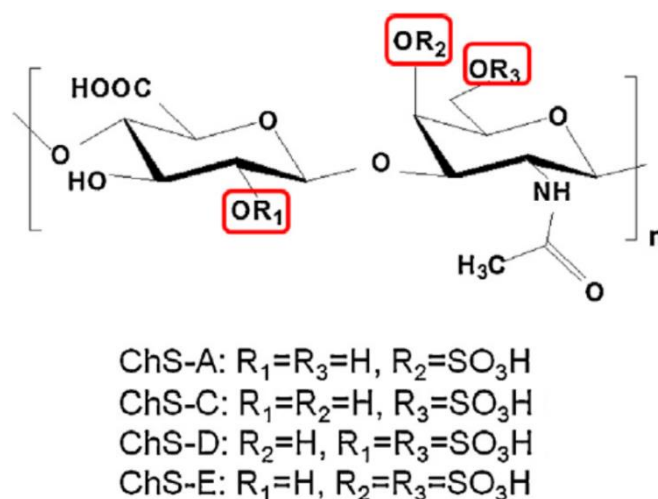


Figura 5.4. Estrutura química dos diferentes tipos de sulfato de condroitina (A, C, D, E), onde estão representadas as unidades de ácido glucurônico e *N*-acetilgalactosamina, ligadas entre si por ligações do tipo β -(1 \rightarrow 3). ChS, sulfato de condroitina. *Adaptado de* (113).

Este polissacarídeo apresenta uma cadeia molecular mais curta que o ácido hialurônico, contendo entre 20 e 100 unidades repetidas. Também o seu peso molecular pode variar entre 10000 e 100000 Da, dependendo da fonte e do tecido de extração (105). O grupo sulfato confere a este polímero uma carga fortemente negativa (112). Tal como os restantes GAG, o sulfato de condroitina possui grupos funcionais, como os grupos hidroxilo e carboxilo, que podem ser alvo de modificações químicas e originar derivados com propriedades adicionais específicas (110). Trata-se também de um polímero biocompatível e, tal como os restantes polissacarídeos sulfatados, a sua degradação pode ser realizada por enzimas hidrolases que facilmente clivam as ligações glicosídicas (4,87).

Relativamente às suas atividades biológicas, o sulfato de condroitina possui atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, antiaterosclerótica, anticoagulante e antitrombótica (109,113). Devido à similaridade estrutural com o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina também pode funcionar como ligando do recetor CD44 (114). Como anticoagulante, este polímero tem sido proposto como substituto natural da heparina, um dos anticoagulantes mais utilizados. Na indústria farmacêutica, o sulfato de condroitina tem sido utilizado como princípio ativo com propriedades anticoagulantes, como suplemento para prevenir a artrite e como material de matriz no desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos (3). Por possuir uma carga superficial altamente negativa que possibilita a

hidratação de tecidos através da absorção de água e por possuir propriedades anti-inflamatórias, este polímero é bastante utilizado para o tratamento da osteoartrose ou outras doenças que causam dano à cartilagem (105,113).

5.4. Carragenina

A carragenina é um polissacarídeo sulfatado e consiste num dos constituintes mais abundantes da parede celular das algas vermelhas, sendo a espécie *Chondrus crispus* considerada a fonte original deste polímero. Porém, a elevada procura da carragenina, em consequência do aumento das suas aplicações na indústria, levou à sua extração a partir de novas espécies, como as espécies *Kappaphycus alvarezii* e *Eucheuma denticulatum* (4).

A estrutura química da carragenina consiste numa cadeia linear de unidades repetidas de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose, unidas alternadamente por ligações glicosídicas do tipo α -(1→3) e β -(1→4) (Figura 5.5). Em termos estruturais, a carragenina é classificada em vários tipos, incluindo, entre outras, a κ -, λ -, ι -, μ -, θ -, β - e ν -carragenina. Todas as formas deste polissacarídeo contêm entre 15 e 40% de grupos sulfato, com exceção da β -carragenina que não apresenta teor em sulfato (115,116). Apesar de na literatura serem referidas pelo menos 15 estruturas químicas diferentes para a carragenina, as formas *kappa* (κ), *lambda* (λ) e *iota* (ι), representam as formas de maior relevância para a indústria. A principal diferença entre os vários tipos de carragenina relaciona-se com as suas características estruturais, como o número e a posição dos grupos sulfato e a frequência dos resíduos 3,6-anidro-D-galactose (3,6-AG) na cadeia molecular (117). Por exemplo, a κ -, a λ - e a ι -carragenina contêm um, dois e três grupos sulfato por cada unidade de dissacarídeo, respetivamente (118). As estruturas químicas deste polímero são, portanto, muito heterogéneas, o que está relacionado com a fonte, o estágio de vida da alga e os procedimentos de extração utilizados (4).

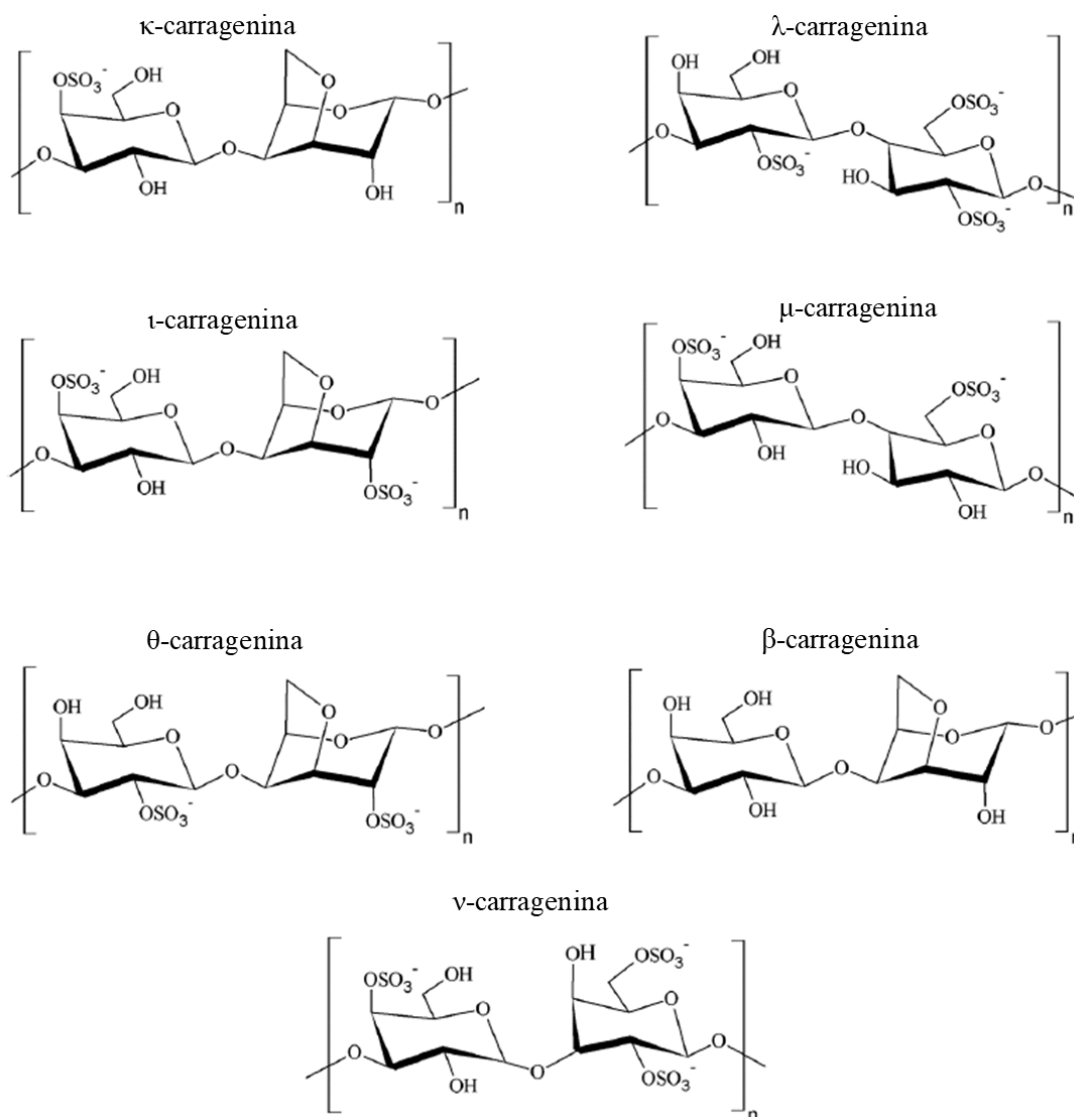


Figura 5.5. Estrutura química das várias formas da carragenina, onde estão representadas as unidades de D-galactose e 3,6-anidro-D-galactose, unidas por ligações glicosídicas. *Adaptada de (4).*

Relativamente às propriedades físico-químicas, este polímero caracteriza-se pela sua carga negativa, devido à presença dos grupos sulfato na sua composição, e por um elevado peso molecular, que pode variar no intervalo entre 100 e 1000 kDa (4,119). A carragenina é solúvel em água e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, como o álcool, o éter e o óleo. A solubilidade aquosa da carragenina é influenciada por vários fatores, incluindo a forma da carragenina, a temperatura, o pH, o número de catiões e a presença de outros solutos em solução. De uma forma geral, as propriedades hidrofílicas da carragenina estão relacionadas com os grupos hidrofílicos sulfato e hidroxilo, enquanto os resíduos 3,6-AG apresentam características mais hidrofóbicas (4). Portanto, a λ-carragenina, uma vez que é bastante sulfatada e não apresenta resíduos 3,6-AG, é facilmente solúvel na maioria das condições, enquanto a κ-carragenina, com resíduos 3,6-AG e menos grupos sulfato, é relativamente menos

hidrofílica e, portanto, menos solúvel. Por outro lado, a ι -carragenina é mais hidrofílica, devido à presença de dois grupos sulfato que neutralizam o leve caráter hidrofóbico do resíduo 3,6-AG. As formas da carragenina estão disponíveis no mercado como sais de sódio, potássio, cálcio e, ainda, como uma mistura entre estes sais, de forma a garantir a estabilidade do polímero. A solubilidade deste polímero é, também, influenciada pela forma de sal dos grupos sulfato. Como tal, as formas sódicas da carragenina são mais facilmente solúveis, enquanto as formas potássicas se dissolvem com mais dificuldade (120).

A carragenina é comercializada na forma de pó, que se dissolve lentamente à temperatura ambiente, produzindo uma solução aquosa altamente viscosa. A viscosidade depende do tipo da carragenina, do seu peso molecular, da concentração do polímero, da temperatura aplicada e da presença de outros solutos (como sais) na solução. Neste contexto, a viscosidade de uma solução de carragenina diminui com a redução da sua concentração, sulfatação, peso molecular e com o aumento da temperatura (4).

A presença de catiões em solução, juntamente com a conformação das unidades de galactose na cadeia polimérica (que resulta em diferentes formas de carragenina), determinam as propriedades gelificantes deste polissacarídeo (120). A gelificação térmica é uma propriedade extremamente relevante deste polímero para aplicações na indústria alimentar e farmacêutica (4). Dentro de uma certa faixa de temperaturas e de concentrações de catiões, as soluções de carragenina podem gelificar e as propriedades viscoelásticas desses géis variam dependendo desses parâmetros (121). As formas da carragenina diferem na sua capacidade de sofrer gelificação. Enquanto a κ - e ι -carragenina formam géis, a λ -carragenina não gelifica e comporta-se como um polieletrólito comum em solução (4). No que concerne ao mecanismo de gelificação da carragenina, supõe-se que, quando esta é dissolvida com recurso a aquecimento e, de seguida submetida a um arrefecimento, a redução da temperatura induz a formação de duplas hélices (Figura 5.6). Nestas condições, as estruturas das κ - e ι -carragenina permitem que os segmentos de duas moléculas formem duplas hélices, originando uma rede tridimensional. Pelo contrário, a λ -carragenina possui uma estrutura que não permite a formação desta dupla hélice, devido ao seu grande teor em grupos sulfato, o que dificulta a formação do gel (121). No entanto, a formação da estrutura helicoidal, por si só, não origina a gelificação da carragenina. Os catiões presentes em solução, como o sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}), são responsáveis pela transição da solução para um gel final, pois possibilitam a agregação entre as hélices (4). Deste modo, a capacidade da carragenina em formar géis termorreversíveis ou soluções muito viscosas, possibilita a sua aplicação como agente gelificante, estabilizante e emulsificante na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética (4).

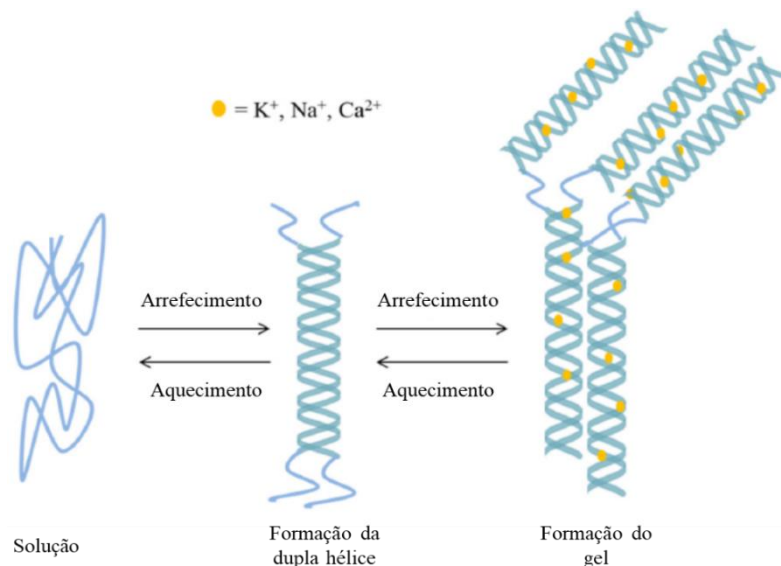


Figura 5.6. Formação do gel de carragenina. As estruturas das κ - e ι -carragenina permitem que segmentos de duas moléculas formem duplas hélices, originando uma rede tridimensional. Os cátions Na⁺, K⁺ e Ca²⁺ são necessários para induzir a transição de solução para um gel final. *Adaptado de (4).*

No que diz respeito à sua biodegradação, as ligações glicosídicas dos polissacarídeos sulfatados podem ser facilmente clivadas pelas enzimas hidrolases. Outra característica relevante nos polissacarídeos sulfatados refere-se à presença de grupos sulfato na estrutura molecular, o que possibilita a sua funcionalização para aplicações específicas. Além disso, a também a presença de grupos hidroxilo na estrutura dos polímeros permite uma adaptação específica aos objetivos pretendidos (4).

Para além das propriedades físico-químicas da carragenina, também as suas atividades biológicas justificam o grande interesse neste polímero. Neste sentido, várias atividades biológicas foram descritas para a carragenina nos últimos anos, incluindo, principalmente, a atividade anticoagulante, antiviral e antitumoral (120). A carragenina possibilita uma redução significativa dos níveis séricos de colesterol e triglicéridos e, é ainda conhecida pela sua capacidade inflamatória sendo, inclusivamente, utilizada num dos mais frequentes protocolos de indução de inflamação, para avaliação de substâncias anti-inflamatórias (125,126).

5.5. Fucoïdano

O termo fucoïdano designa uma família de polissacarídeos sulfatados derivados de algas marinhas castanhas (*Phaeophycophyta*) e, também, de alguns equinodermos (ouriço-do-mar e pepino-do-mar) (4). As algas castanhas (*Phaeophyta*), o segundo grupo mais abundante de algas, constituem uma fonte de vários compostos ativos. A estrutura das suas paredes celulares consiste numa matriz amorfa de polissacarídeos, ligados entre si por proteínas. Estes polissacarídeos são principalmente o fucoïdano e o alginato, que conferem resistência estrutural e flexibilidade a estas algas (127). Nos últimos anos, o fucoïdano tem sido isolados de diferentes fontes, tais como as espécies *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica* e *Macrocystis pyrifera* (4,94). Contudo, antes de escolher a fonte, é importante ter em conta que a estrutura química deste polissacarídeo pode ser diferente entre espécies de algas e pode variar até na mesma espécie. Devido a esta heterogeneidade estrutural, diferentes condições de extração resultam na extração de diferentes formas de fucoïdano (118). Para além disso, deve-se ter em atenção que alguns métodos de extração do fucoïdano podem alterar a sua estrutura química, afetando a sua bioatividade e as suas propriedades físico-químicas (128).

Embora o fucoïdano seja conhecido há mais de um século, a sua estrutura química ainda não está completamente determinada, como consequência da sua heterogeneidade e irregularidade. Isto deve-se ao facto de que as algas castanhas sintetizam polissacarídeos muito ramificados, cujas estruturas e proporções variam dependendo da espécie (129–131). Estruturalmente, o fucoïdano consiste essencialmente em unidades de L-fucose. A sulfatação destes resíduos pode ocorrer em posições específicas, como em C-2 e/ou C-4 e, apesar de raro, em C-3, dependendo da espécie da alga (132,133). Além da fucose e do sulfato, este polissacarídeo também pode conter na sua estrutura química constituintes adicionais de açúcar, como a manose, galactose, glicose, xilose, ácidos urónicos e ainda grupos acetilo (134–137). Porém, a presença destes constituintes não foi estabelecida como um padrão regular. Por outro lado, observou-se alguma semelhança na estrutura química de diferentes moléculas de fucoïdano no que diz respeito às posições das ligações interglicosídicas. Muitos estudos demonstraram que várias espécies das ordens *Chordariales* e *Laminariales* contêm o polímero fucoïdano com uma estrutura linear composta por resíduos de L-fucose, unidos por ligações do tipo α -(1→3). Todavia, o fucoïdano isolado de algas pertencentes à ordem *Fucales* exhibe na sua composição principalmente resíduos de L-fucose, ligados por ligações alternadas do tipo α -(1→3) e α -(1→4) (133,136,138,139). Estas estruturas químicas estão representadas na Figura 5.7. No geral, estes polímeros podem ser ramificados, possuindo uma variedade de grupos

substituintes e composições nas cadeias laterais. Portanto, os dados sobre a estrutura do fucoidano isolado de diferentes espécies de algas marinhas castanhas indicam, claramente, que não existe uma estrutura básica consistente para este polímero (4).

As propriedades físico-químicas e biológicas do fucoidano estão intimamente relacionados com a sua composição química (4). Esta, por sua vez, é complexa e variável, sendo o resultado de muitos fatores, como a região da colheita, a estação do ano e a espécie da alga (140). O grau de sulfatação do fucoidano pode variar entre 4 e 8%, dependendo do local e da época de colheita das algas (4). O fucoidano é um polissacarídeo aniônico e bastante heterogêneo, não apenas em relação à composição de açúcares e teor de sulfato, mas também em relação ao seu peso molecular, que pode variar entre 10 a aproximadamente 2000 kDa (4,141,142). Este polímero é bastante solúvel e a sua solubilidade está relacionada com o nível de ramificação, dependendo do conteúdo de grupos sulfato (4). Apesar de seu comportamento higroscópico, o fucoidano não desenvolve soluções viscosas não sendo, por isso, utilizado na indústria como agente gelificante, como é o caso de outros polissacarídeos (4,143).

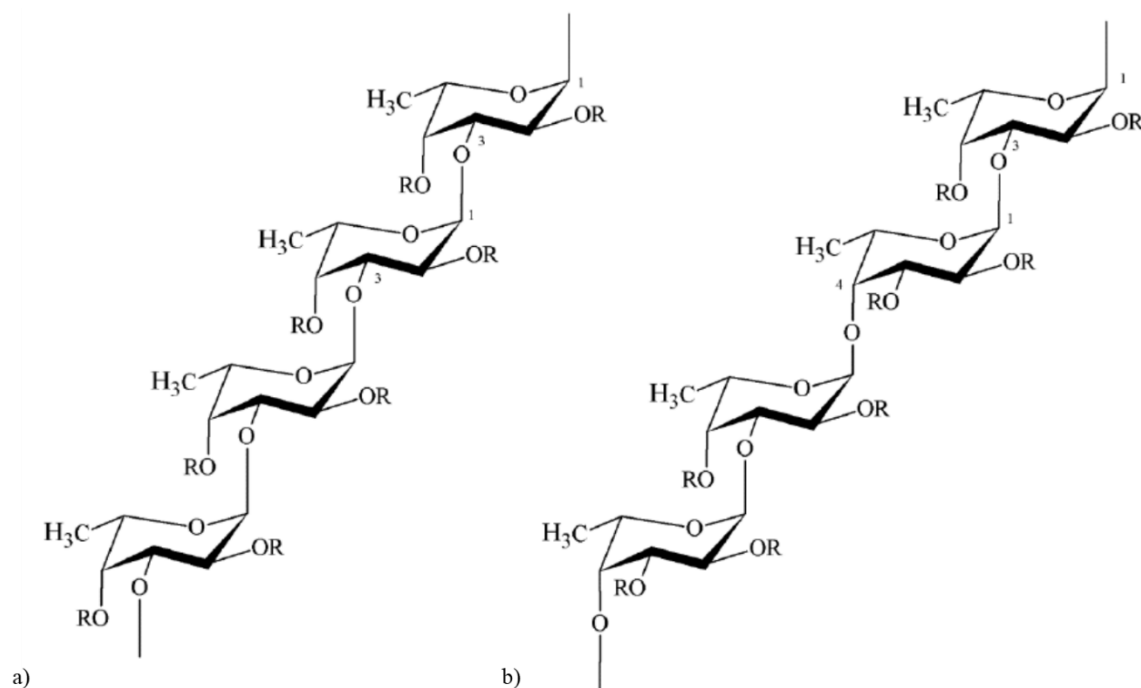


Figura 5.7. Estrutura química do fucoidano isolado de algas pertencentes às ordens taxonômicas (A) *Chordariales* e *Laminariales* e (B) *Fucales*; (A) Unidades de L-fucose unidas por ligações do tipo α -(1→3); (B) Unidades de L-fucose ligadas por ligações alternadas do tipo α -(1→3) e α -(1→4). O R representa as posições de potenciais ligações com resíduos de carboidratos (ácido glicurônico, manose, galactose, xilose) e substituintes não carboidratos (sulfato e acetato). Adaptada de (4).

O fucoidano e os seus oligossacarídeos têm sido alvo de muitos estudos quanto à evidência de diversas atividades biológicas (4). Estas incluem a atividade antitumoral, antiviral,

anticoagulante e anti-inflamatória (141,144–146). Além disso, também o seu efeito anti-metástase, anti-linfangiogênese, bem como o seu efeito imunomodulador, foram demonstrados (147,148). De todas as atividades biológicas já relatadas, a forte atividade anticoagulante do fucoidano é, de longe, a mais investigada. Em síntese, as propriedades do fucoidano tornam este polímero com elevado potencial para aplicações nas áreas farmacêutica e biomédica (4).

5.6. Alginato

O alginato é um polissacarídeo que se encontra na parede celular de algas marinhas castanhas (*Phaeophyceae*), sendo maioritariamente isolado a partir das espécies *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e também *Macrocystis pyrifera*. As bactérias das espécies *Azotobacter* e *Pseudomonas* podem também ser consideradas fontes naturais de alginato não sendo, no entanto, consideradas para fins industriais (149). Este polímero é extraído na forma de ácido algínico, após o qual é convertido, através de um processo químico, na forma de sal, por exemplo, em alginato de sódio, que é comumente utilizado no desenvolvimento de formas farmacêuticas (150).

O alginato é um polímero aniônico e possui uma estrutura linear, constituída pelas unidades de ácido α -1,4-L-gulurónico (G) e ácido β -1,4-D-manurónico (M), que estão dispostas em forma de blocos (Figura 5.8). Estes blocos podem ser formados por resíduos G consecutivos, resíduos M consecutivos e ainda resíduos M e G alternados. A composição dos blocos e a sua distribuição variam de acordo com a fonte de alginato, estações do ano, época de colheita, condições de crescimento e parte das algas marinhas (150). Por exemplo, o alginato extraído das espécies *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum*, demonstrou ter proporções M/G de 1,16 e 1,82, respetivamente (151). Também o seu peso molecular pode variar entre 32 e 400 kg/mol, de acordo com os mesmos fatores (152).

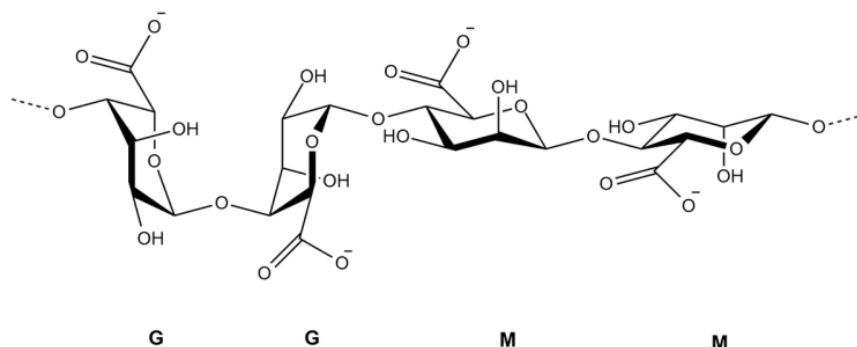


Figura 5.8. Estrutura química do alginato exibindo as unidades α -1,4-L-gulurónico (G) e β -1,4-D-manurónico (M), organizadas em blocos. *Adaptado de* (153).

Este polímero é hidrofílico, sendo solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos (150). A composição dos blocos M e G e a extensão da sua sequência, tal como o peso molecular do polímero, determinam as características físicas e químicas do alginato. A viscosidade varia proporcionalmente com o teor de resíduos G e, principalmente, com o peso molecular do polímero (150). Devido à presença de grupos funcionais na estrutura polimérica, a modificação química da cadeia lateral do alginato tem sido bastante investigada para melhorar as suas propriedades (152).

Tal como o quitosano, o alginato possui propriedades mucoadesivas, prolongando o tempo de contacto com as superfícies mucosas (154). O alginato é também muito conhecido pela sua capacidade de gelificação, pois os grupos de ácido carboxílico das unidades G podem formar complexos em forma de caixa de ovo com cátions divalentes, como o bário (Ba^{2+}) e o Ca^{2+} , formando nanopartículas (Figura 5.9) (152,153,155). Neste mecanismo, um catião divalente pode interagir com quatro grupos de ácido carboxílico (152). Esta característica do alginato impulsionou as suas aplicações farmacêuticas, visto que possibilita a encapsulação de fármacos e uma libertação destes de forma controlada. Desta forma, as suas propriedades gelificantes tornam o alginato um dos polímeros mais utilizados no desenvolvimento de sistemas de administração, nomeadamente de NPP (153,154). Este polímero pode também ser usado como material na cicatrização de feridas e regeneração de tecidos (151).

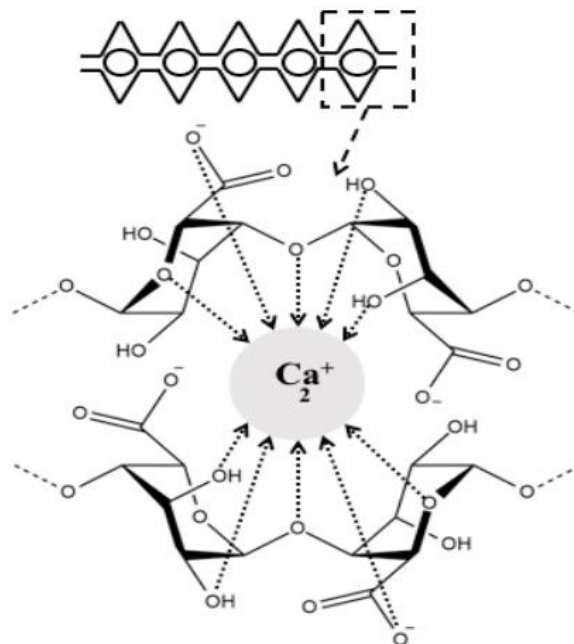


Figura 5.9. Estrutura em caixa de ovo formada pela interação entre um catião de Ca^{2+} e quatro grupos de ácido carboxílico do bloco G do alginato. *Adaptado de* (153).

5.7. Colagénio

O colagénio é a proteína mais abundante no corpo humano, representando mais de 30% da proteína corporal total. É a principal proteína da matriz extracelular dos tecidos biológicos, como a pele, ossos, ligamentos, cartilagem e tendões, onde desempenha um papel estrutural essencial (93,156,157). Atualmente, existem mais de 20 colagénios conhecidos, dos quais o tipo I encontra-se em abundância em todos os tecidos e órgãos, representado cerca de 90% do conteúdo de colagénio corporal; o tipo II ocorre principalmente no tecido cartilaginoso; o tipo III existe na pele, vasos sanguíneos e órgãos; e o tipo IV localiza-se nas membranas basais (2). Estruturalmente, o colagénio é uma molécula trimérica constituída por três cadeias α polipeptídicas, formando uma estrutura terciária de tripla hélice, onde contém vários resíduos de glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 5.10) (156,157).

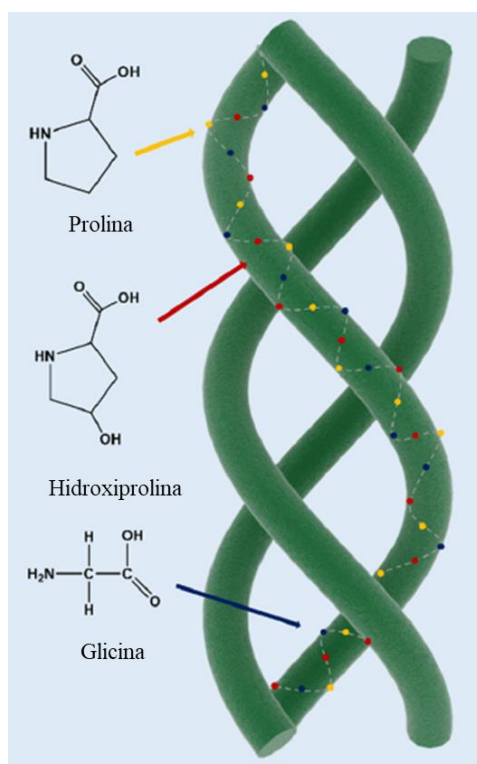


Figura 5.10. Aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina na tripla hélice do colagénio. *Adaptado de (2).*

O colagénio comercial é normalmente isolado de mamíferos terrestres, como bovinos e suínos, e é bastante utilizado nas indústrias alimentar, cosmética, farmacêutica e biomédica. No entanto, devido ao risco de transmissão de doenças virais, surgiram nos últimos anos algumas

preocupações em relação ao uso do colagénio e os seus produtos derivados dos animais terrestres (156). Além disso, a sua purificação é difícil e dispendiosa e as questões religiosas são inevitáveis (156,157). Portanto, existe a necessidade urgente de uma nova fonte de colagénio como alternativa àquela obtida de mamíferos terrestres. O colagénio marinho é quase exclusivamente do tipo I e pode ser isolado de peixes, algas marinhas, esponjas, águas-vivas, ouriços-do-mar, estrelas-do-mar e pepinos-do-mar (93,156). Este polímero pode trazer vantagens sobre o colagénio isolado de mamíferos, uma vez que pode ser facilmente extraído e existe em abundância na natureza (3). Para além disso, o seu uso é seguro, pois evita o risco de desenvolvimento de doenças, e evita a poluição que se deve à grande quantidade de subprodutos marinhos (156,157). Porém, a complexidade e diversidade do ambiente marinho são superiores às do ambiente terrestre, pelo que pode existir uma diferença entre a composição e a estrutura do colagénio marinho e o colagénio terrestre (2).

Também o colagénio possui potencial para ser utilizado em diversas áreas, como a engenharia de tecidos, administração de fármacos e medicina regenerativa, devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade, solubilidade aquosa e elevada versatilidade (156).

6. Nanopartículas de polímeros de origem marinha

As NPP foram desenvolvidas como uma abordagem física para alterar e melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de vários tipos de moléculas. Como já foi mencionado, em comparação com as formas farmacêuticas convencionais, estes sistemas oferecem muitas vantagens, tais como a possibilidade de administração por várias vias, adaptação do tamanho e características da superfície e, ainda, a possibilidade de promover uma libertação controlada e sustentada do fármaco em locais específicos. A aplicação de polímeros marinhos no desenvolvimento de NPP têm sido alvo de muito estudos, muito devido à sua natureza iónica que permite a formação de complexos com polieletrólitos de carga oposta. Esta característica tem sido considerada muito útil no desenvolvimento de NPP, uma vez que os complexos polieletrólíticos permitem a associação de fármacos na matriz polimérica a um nível molecular (4).

6.1. Nanopartículas de quitosano

Até aos dias de hoje, muitos materiais têm sido aplicados na produção de NPP. Contudo, no que diz respeito à administração por vias mucosas, uma das estratégias mais promissoras consiste na incorporação de polímeros mucoadesivos, dado que se sabe que esta característica prolonga o tempo de residência das NPP nos locais de absorção, resultando assim numa maior permeação de fármacos. Neste sentido, a aplicação do quitosano e os seus derivados tornou-se particularmente interessante para a produção de NPP, devido ao seu potente carácter mucoadesivo. Além disso, devido ao seu carácter catiónico e solubilidade em soluções aquosas, o quitosano pode interagir com polímeros de carga oposta, macromoléculas e pequenos aniões presentes nos meios aquosos (24).

A via oral é a mais comum das vias de administração sistémicas, devido à sua conveniência e elevada aceitabilidade pelos doentes. De uma forma geral, a administração oral de fármacos é simples, segura, não invasiva, sendo a via preferencial de administração nos estudos de desenvolvimento de novos medicamentos. Devem também ser mencionadas outras características relevantes, como a grande área de superfície do intestino (aproximadamente 200 m²) disponível para absorção e a sua elevada vascularização (24). Contudo, a biodisponibilidade dos fármacos administrados por via oral é reduzida, devido aos ambientes gástrico e intestinal hostis, e também à permeabilidade limitada na mucosa gastrointestinal (54).

Para superar estas limitações inerentes, é necessário o desenvolvimento de sistemas de administração que mantenham a funcionalidade dos fármacos e, ao mesmo tempo, que aumentem a sua biodisponibilidade. Assim sendo, estes sistemas devem conferir proteção aos fármacos e devem permitir uma interação íntima com o epitélio intestinal, possibilitando que os fármacos atravessem a barreira intestinal (24). De entre as abordagens desenvolvidas para cumprir este fim, as NP-QS têm demonstrado grande potencial, devido às suas propriedades mucoadesivas e à sua capacidade de abertura transitória das junções estreitas na mucosa intestinal (24,54). Estas nanopartículas têm sido propostas para atingir locais específicos do trato gastrointestinal, atuando como um sistema sensível ao pH. Além disso, demonstraram resultados promissores na vacinação oral, aproveitando o facto de que o epitélio intestinal possui células apresentadoras de antígenos especializadas (células M) localizadas nas placas de Peyer. A vacinação através da via mucosa apresenta várias vantagens em comparação com a imunização parentérica, visto que evita uma injeção e causa a indução de respostas imunitárias locais, bloqueando os agentes patogénicos na sua porta de entrada antes de se estabelecerem no organismo (24).

Feng *et al.* descreveram uma abordagem de administração de fármacos antitumorais por via oral. Este estudo consistiu no uso de nanopartículas de quitosano e de o-carboximetil quitosano (NP-QS/CMQS), sensíveis a alterações de pH, como sistemas de administração da DOX. As NP-QS/CMQS apresentaram uma maior taxa de libertação da DOX em pH neutro (Figura 6.1). Os estudos *ex vivo* indicaram que as NP-QS/CMQS aumentaram a absorção da DOX no intestino delgado, especialmente no jejuno e no íleo. A administração oral das NP-QS/CMQS proporcionou uma biodisponibilidade absoluta de 42%. Relativamente à biodistribuição e toxicidade das NP-QS/CMQS em ratos, observaram-se níveis reduzidos de DOX no coração e nos rins e, conseqüentemente, uma diminuição da toxicidade cardíaca e renal. Assim sendo, este sistema nanotecnológico representa uma abordagem promissora para a quimioterapia oral (158).

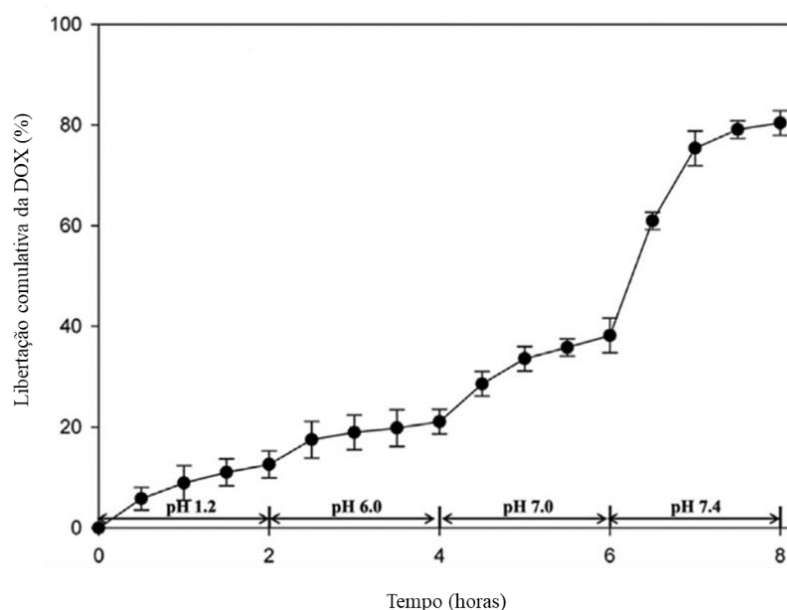


Figura 6.1. Perfil de liberação da DOX a partir das NP-QS/CMQS em diferentes pH que simulam o trato gastrointestinal. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 4). *Adaptado de* (158).

As proteínas terapêuticas estão disponíveis para o tratamento de uma ampla gama de doenças, como o cancro, doenças autoimunes e distúrbios metabólicos. Todavia, a sua estabilidade reduzida e o tempo de semivida curto, limitam a eficácia da terapêutica após administração parenteral. Consequentemente, torna-se necessária uma elevada concentração do fármaco ou uma maior frequência de dosagem, o que pode provocar efeitos adversos. Além disso, como resultado da natureza invasiva, as formulações injetáveis causam desconforto ao doente. Como tal, as NP-QS foram estudadas para a administração de proteínas e peptídeos. Geralmente, este tipo de substâncias são administrados por via parenteral, devido à sua reduzida biodisponibilidade e/ou imunogenicidade quando administradas por vias não parenterais. Contudo, nos últimos anos, as vias mucosas têm sido bastante estudadas para a administração de proteínas, melhorando a adesão do doente à terapêutica (54).

Um conjugado de trimetilquitosano e cisteína foi sintetizado por Yen *et al.* na tentativa de combinar as propriedades de mucoadesão e os efeitos do aumento da permeação. Posteriormente, foram preparadas nanopartículas de trimetilquitosano/cisteína (NP-TMQS/Cis) para a administração da insulina. Estas nanopartículas apresentaram uma elevada capacidade de encapsulação da insulina e apresentaram uma maior capacidade de mucoadesão em comparação com as nanopartículas de trimetilquitosano (NP-TMQS). Além disso, em comparação com uma solução de insulina e com as NP-TMQS, as NP-TMQS/Cis promoveram

a internalização em células Caco-2, induzindo um aumento na captação da insulina no intestino do rato. As NP-TMQS/Cis também mostraram uma diminuição significativa nos níveis de glicose no sangue após a administração oral e ileal (Figura 6.2). A avaliação da biocompatibilidade das NP-TMQS/Cis revelou ausência de toxicidade (159).

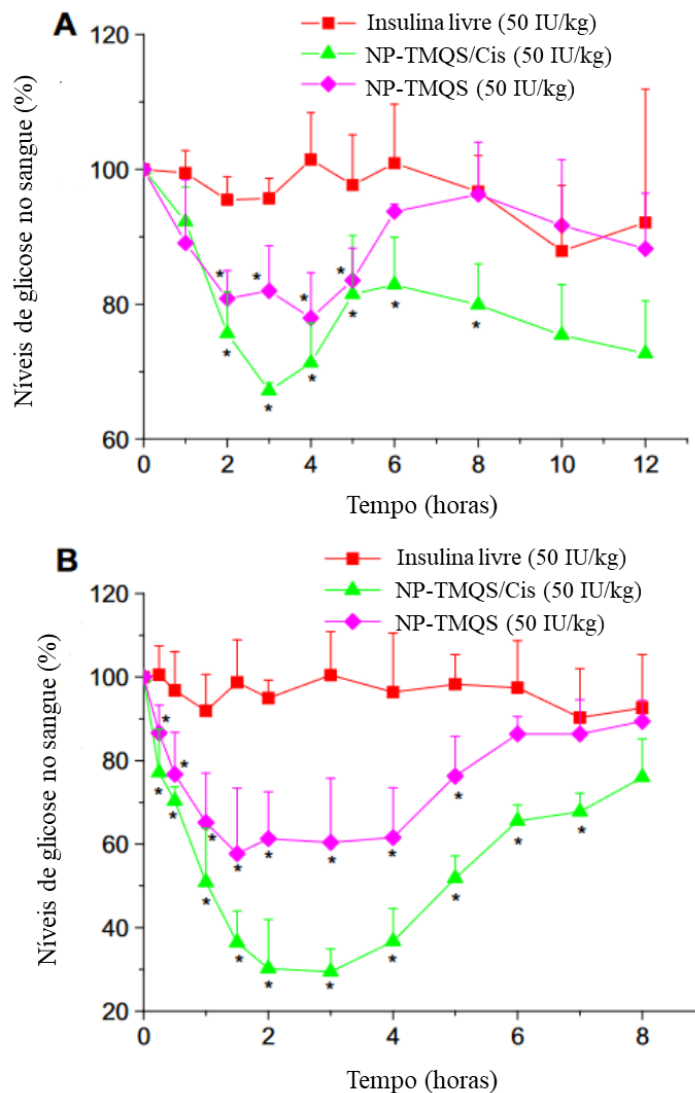


Figura 6.2. Níveis de glicose no sangue em ratos após a administração oral (A) e ileal (B) de NP-TMQS e NP-TMQS/Cis (50 UI/kg). Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 4). Diferença significativa da solução de insulina: $p < 0,05$. Adaptado de (159).

Conforme referido anteriormente, uma das aplicações mais promissoras das NP-QS consiste na vacinação oral. Slutter *et al.* estudaram as nanopartículas de quitosano e TPF (NP-QS/TPF), com dimensões de 300 nm, para compreender os mecanismos pelos quais a administração oral de nanopartículas carregadas com antígeno induz uma resposta imunitária.

Para tal, utilizou-se a ovalbumina (OVA) como antigénio modelo, estando associada às NP-QS/TPF com uma eficiência de 65%. Os estudos realizados em células Caco-2 indicaram ausência de toxicidade significativa induzida pelas NP-QS/TPF. A administração oral das NP-QS/TPF carregadas com OVA a ratinhos induziu um aumento significativo na produção de IgG (mais de 1000 vezes) em comparação com a imunização intraduodenal com a OVA livre. Os autores concluíram que este efeito de reforço imunitário das nanopartículas baseadas no quitosano não deve ser atribuído à sua capacidade de modificar as junções estreitas, mas sim à absorção específica pelas células M (160).

A mucosa nasal é uma via de administração interessante, pois permite uma rápida absorção e, portanto, um rápido início de ação terapêutica, que se deve à grande área de superfície disponível para absorção e à alta vascularização. No entanto, a biodisponibilidade de alguns fármacos administrados por via nasal pode ser reduzida, devido ao metabolismo do fármaco e à permeabilidade limitada. As tentativas de superar os referidos problemas de biodisponibilidade concentraram-se, principalmente, na inclusão de intensificadores de absorção nas formulações desenvolvidas. Contudo, estes são frequentemente relatados como indutores de irritação da mucosa e estase ciliar no local de administração, exigindo cuidado no seu uso. As NP-QS surgiram neste contexto como uma potencial alternativa mucoadesiva, demonstrando atuar como importantes intensificadoras da absorção de fármacos, sendo ao mesmo tempo seguras (24).

É importante referir que o aumento do interesse pela via de administração nasal também é reflexo da incrível possibilidade de imunização, bem como do potencial de atingir o sistema nervoso central (SNC) de forma rápida. A cavidade nasal para obtenção de vacinação, especialmente contra infeções respiratórias, tem sido frequentemente relatada e está relacionada ao facto de que a maioria dos agentes patogénicos invadem os seus hospedeiros humanos através das superfícies mucosas. Portanto, tal como foi mencionado para a administração oral, a imunização mucosa é vantajosa em comparação com a vacinação parentérica. De facto, o grande interesse desta via na administração de vacinas surgiu como consequência da demonstração de que pode proporcionar não só uma resposta imunitária sistémica, mas também uma resposta mucosa local, proporcionando uma barreira de proteção adicional. Além disso, o facto de a imunização nasal não necessitar de agulhas, que podem ser fontes potenciais de infeção, proporciona uma excelente possibilidade de vacinação para países subdesenvolvidos (24).

A segunda abordagem mencionada de administração nasal é a presença, recentemente sugerida, de uma via direta da cavidade nasal para o SNC, permitindo assim o direcionamento

de fármacos para o cérebro através dos neurónios olfativos. Os estudos realizados com alguns fármacos demonstraram que a sua concentração no cérebro é maior após instilação nasal do que após administração intravenosa. Isto é especialmente importante para medicamentos que não são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica (24).

Alguns autores testaram as NP-QS como um sistema de administração nasal de insulina. Por exemplo, Zhang *et al.* utilizaram NP-QS modificadas com o PEG, para uma melhor absorção sistémica da insulina, após a sua administração nasal. As NP-QS foram preparadas por gelificação iónica, utilizando o TPF como agente de reticulação, e o seu tamanho variou entre 150 e 300 nm, com uma carga elétrica positiva entre 16 e 30 mV e com uma capacidade de associação à insulina entre 20 e 39%. Os estudos de libertação *in vitro* mostraram uma libertação inicial rápida, seguida por uma libertação gradual da insulina. A administração nasal das NP-QS em coelhos aumentou a absorção nasal da insulina, em comparação com a proteína livre (Figura 6.3). As NP-QS modificadas com o PEG são, portanto, veículos promissores para a administração da insulina através da mucosa nasal (17).

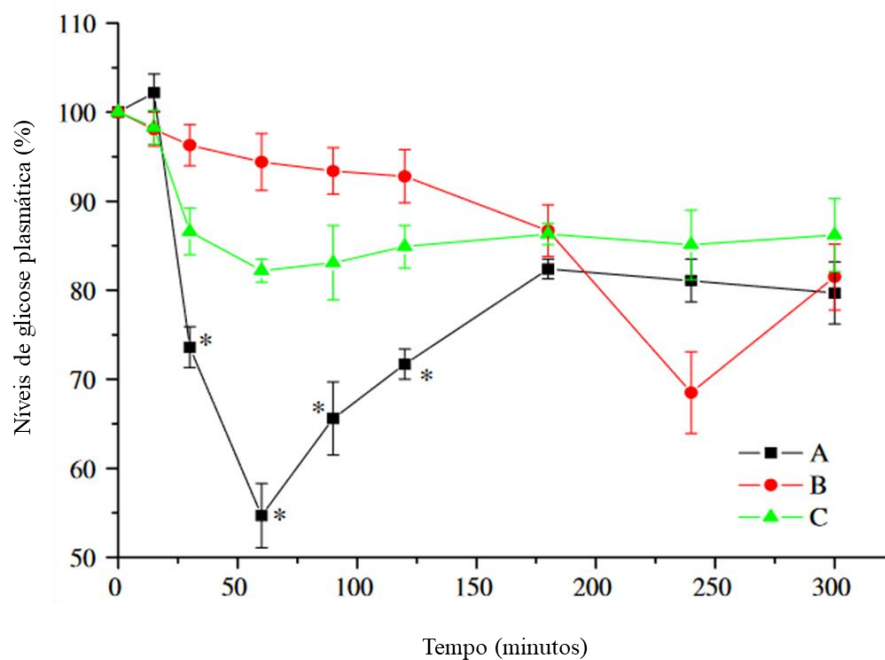


Figura 6.3. Níveis de glicose plasmática em coelhos após administração nasal (pH de 7,4) de: A, NP-QS modificadas com o PEG e carregadas com insulina suspensas em PBS; B, suspensão de insulina com o quitosano modificado com o PEG em PBS; C, insulina em PBS. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 6). * Diferenças estatisticamente significativas em relação à solução controle de insulina ($p < 0,05$). PBS, solução fosfato salino. Adaptado de (17).

Também Wang *et al.* propuseram a aplicação de nanopartículas baseados no quitosano modificado com *N*-acetil-L-cisteína (NP-QSAC), para a administração nasal da insulina. Para este estudo foram preparadas NP-QSAC por gelificação iónica com TPF, com um tamanho

entre 140 e 210 nm, potencial zeta positivo entre 19,5 e 31,7 mV e capacidade de associação à insulina entre 13 e 42%. Em solução aquosa, observou-se uma libertação inicial rápida da insulina, seguida de uma libertação de forma gradual. Estes autores observaram que a administração das NP-QSAC por via nasal em ratos, aumentou a absorção da insulina pela mucosa nasal, em comparação com as NP-QS não modificadas e a solução de insulina livre, o que provavelmente se deve à maior capacidade adesiva das nanopartículas modificadas. Portanto, estes resultados comprovam que as NP-QSAC representam um veículo promissor para a administração nasal da insulina (161).

O grupo Nagamoto *et al.* descreveram a eficácia das NP-QS para a imunização nasal de ratos, utilizando a toxina da cólera e a OVA como antígenos modelo. As NP-QS foram produzidas por dissolvatação com sulfato de sódio e os antígenos modelo foram associados por incubação com as nanopartículas previamente formadas, obtendo-se uma eficiência de associação superior a 80%. As NP-QS produzidas atingiram tamanhos em torno de 400 nm. A imunização de ratos demonstrou que a administração nasal de NP-QS induziu os níveis de IgG, sendo estes comparáveis aos obtidos por injeção intraperitoneal (Figura 6.4A). Também os títulos de IgA foram significativamente superiores aos obtidos comparativamente às vacinas fluídas (Figura 6.4B). Estas nanopartículas demonstraram ser mais eficazes na obtenção de imunização da mucosa em comparação com partículas maiores (1 e 3 µm), induzindo níveis mais elevados de IgA. Isto foi justificado pelo facto de que as micropartículas são retidas apenas nas células M, enquanto as nanopartículas também podem ser captadas pelo tecido linfóide associado ao nariz, causando não apenas a resposta imunitária na mucosa, mas também sistémica (162).

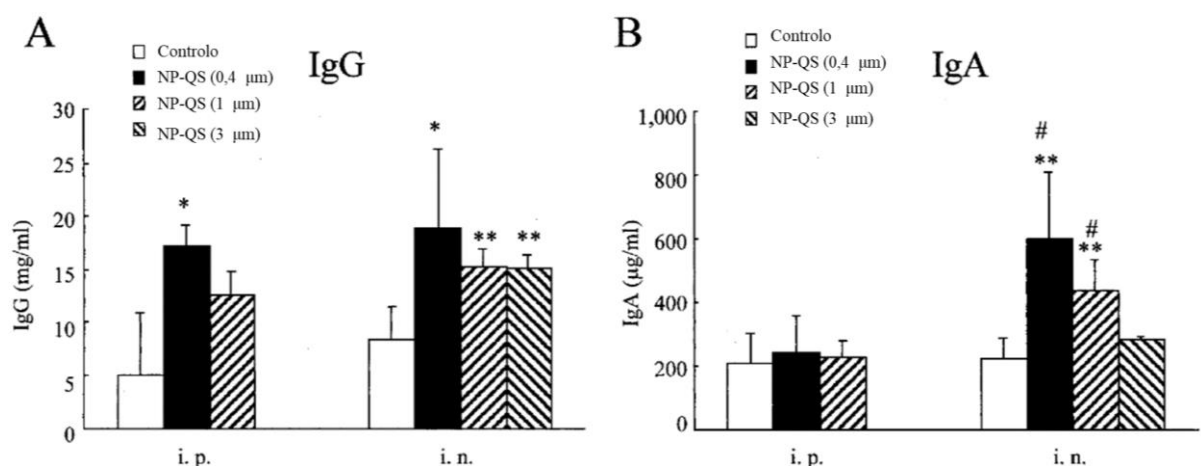


Figura 6.4. As concentrações de (A) IgG e (B) IgA de ratos (n = 3 a 5) imunizados por via intraperitoneal e intranasal nos dias 0, 14 e 28 com OVA (5 mg/kg) e toxina da cólera (2,5 g/kg) livres como controlo e veiculadas nas NP-QS. O diâmetro das NP-QS é de aproximadamente 0,4 µm, 1 µm e 3 µm. Os soros foram recolhidos no dia 35. Os dados representam a média e o desvio padrão. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

em comparação com o grupo controlo; # $p < 0,05$ em comparação com as NP-QS de 3 μm . i.p., intraperitoneal; i.n., intranasal. *Adaptado de* (162).

É importante citar um trabalho que aproveita a via direta entre a cavidade nasal e o SNC e propõe as NP-QS como veículos de estradiol para o SNC no tratamento da doença de Alzheimer. As NP-QS foram preparadas por gelificação iónica, utilizando o TPF, e apresentaram um tamanho de 270 nm e uma eficiência de associação com o estradiol de 65%, sendo posteriormente administradas a ratos por via nasal. Os resultados mostraram que, embora os níveis plasmáticos de estradiol tenham sido mais baixos na administração nasal em comparação com uma injeção intravenosa, a concentração do fármaco no líquido cefalorraquidiano foi significativamente maior quando a administração nasal foi realizada, em comparação com o seu controlo por injeção intravenosa (Figura 6.5) (163).

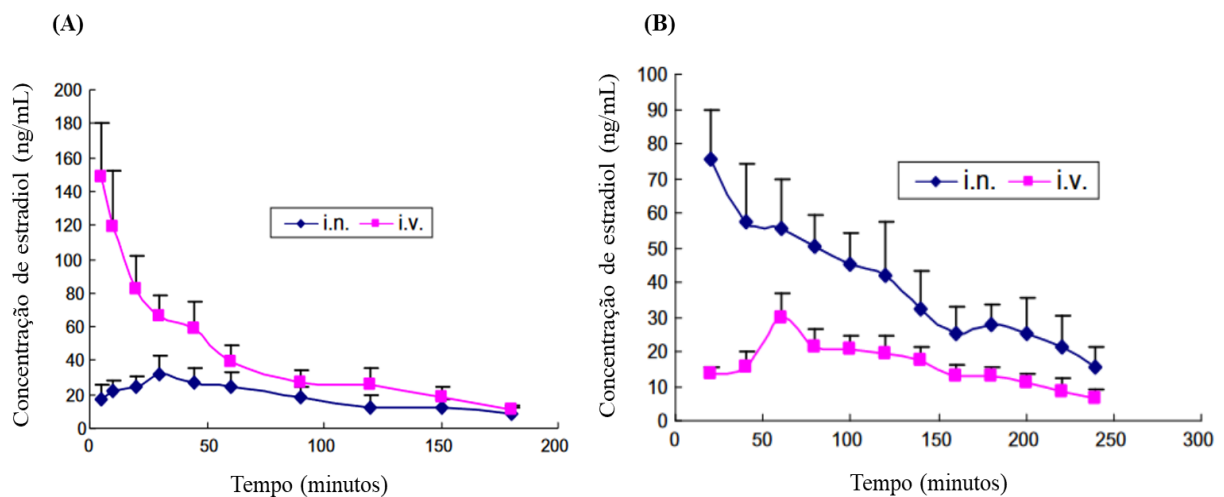


Figura 6.5. (A) Concentração de estradiol no plasma em ratos após a administração intranasal e intravenosa de NP-QS contendo estradiol na dose de 0,48 mg kg⁻¹. (B) Concentração de estradiol no líquido cefalorraquidiano em ratos após a administração intranasal e intravenosa de NP-QS contendo estradiol na dose de 0,48 mg kg⁻¹. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 5). i.n., intranasal; i.v., intravenoso. *Adaptado de* (163).

A administração pulmonar de fármacos para tratamentos locais e sistémicos apresenta muitas vantagens sobre outras vias de administração (54). Desde já, os pulmões apresentam uma grande área de superfície disponível para absorção (entre 43 e 102 m²). Também a depuração nos alvéolos dos pulmões é mais lenta comparativamente às vias aéreas e o metabolismo hepático de primeira passagem é evitado. Além disso, o epitélio pulmonar é menos espesso e altamente vascularizado, possibilitando a absorção sistémica de fármacos (24,54). Independentemente do método utilizado para produzir o aerossol, antes de atingir o pulmão

profundo as partículas inaladas devem superar alguns obstáculos e mecanismos de defesa do pulmão, entre os quais o efeito da estrutura das vias aéreas ramificadas e a camada de muco que protege o epitélio na região traqueobrônquica.

A administração eficiente das partículas inaladas depende principalmente de seu tamanho e densidade, ou seja, do diâmetro aerodinâmico. As partículas direcionadas ao pulmão profundo devem ser pequenas o suficiente para passar pela boca, garganta e vias aéreas condutoras até aos alvéolos. Porém, se forem muito pequenas, não conseguem depositar, sendo novamente expirados. Portanto, elas devem ter um diâmetro aerodinâmico entre 1 e 5 μm , de modo a garantir a máxima deposição no pulmão profundo e, conseqüentemente, a sua absorção sistêmica. Uma vez no pulmão profundo, as partículas terão de enfrentar pelo menos dois outros mecanismos de defesa: os macrófagos alveolares e a atividade enzimática. A superfície alveolar é recoberta pelo surfactante pulmonar com macrófagos suspensos, que desempenham um papel importante na defesa pulmonar. Com a capacidade de se movimentarem livremente na superfície, são capazes de englobar substâncias “estranhas” da superfície das vias aéreas, eliminando agentes potencialmente prejudiciais. Não existe consenso sobre a faixa de tamanho ideal para evitar ou retardar a fagocitose. No entanto, foi relatado que a atividade fagocitária é máxima para partículas de 1–2 μm , diminuindo tanto para partículas menores como maiores que essa faixa. Quanto à atividade enzimática, sabe-se que o pulmão apresenta menor atividade enzimática quando comparado a outras superfícies mucosas, como o estômago. Todavia, algumas enzimas já foram identificadas, como inibidores da protease, isoenzimas da família do citocromo P-450 e lisozimas (54).

As nanopartículas possuem um grande potencial para administração pulmonar sistêmica, uma vez que o seu reduzido tamanho permite evitar a depuração mucociliar e a atividade fagocitária. Além disso, as NP-QS são eficientemente absorvidas pelas células epiteliais alveolares. No entanto, a utilidade dos sistemas nanoparticulados para aplicação pulmonar é prejudicada, devido à baixa inércia causada pelas dimensões e massa excessivamente pequenas, o que faz com que escapem à deposição pulmonar e sejam predominantemente expirados. A combinação de alguns sistemas de administração para formar um único sistema complexo, como a produção de pós secos contendo sistemas coloidais, a fim de solucionar limitações aerodinâmicas e de estabilidade, foi recentemente proposta por vários autores (24).

Grenha *et al.* adotaram esta estratégia para a administração pulmonar de NP-QS carregadas com insulina bovina. As NP-QS/TPF de aproximadamente 300 nm, obtidas por gelificação iônica, foram encapsuladas com sucesso em microesferas de manitol, através da

técnica de *spray-drying*. Obteve-se um pó seco com ótimas propriedades aerodinâmicas para administração pulmonar, exibindo diâmetros aerodinâmicos variando entre 2 e 3 μm . Esta formulação de nanopartículas na forma de pó seco exibe maior estabilidade, além de possibilitar um manuseio mais fácil das nanopartículas. A ação terapêutica da insulina requer uma absorção sistêmica, exigindo que as microesferas cheguem ao pulmão profundo, onde se espera que estas se dissolvam em nanopartículas, possibilitando posteriormente a libertação do peptídeo. A capacidade das microesferas em propiciar este processo foi demonstrada *in vitro*, quando as NP-QS/TPF foram recuperadas sem alterações de tamanho e potencial zeta, depois do contacto das microesferas com um meio aquoso de pH semelhante ao do líquido do revestimento pulmonar (aproximadamente de 7). Também o processo de microencapsulação demonstrou não afetar o perfil da libertação da insulina. Este sistema combinado também demonstrou biocompatibilidade *in vitro* com duas linhas de células epiteliais pulmonares, Calu-3 e A549. Além disso, embora a internalização celular das nanopartículas não tenha sido observada após 2 hora de incubação, a bioadesão foi claramente evidente, certamente como resultado da presença do quitosano, aumentando o tempo de residência e, conseqüentemente, o aumento da absorção da molécula encapsulada. De facto, a administração intratraqueal *in vivo* deste sistema combinado a ratos revelou uma resposta hipoglicémica significativamente mais forte (redução de 70% da glicose basal) em comparação com a obtida com a administração de uma solução de insulina com a mesma dosagem (redução de 40% da glicose basal). Em suma, as NP-QS/TPF carregadas com proteínas podem ser incorporadas com sucesso em microesferas com características adequadas para atingir o pulmão profundo e em contato com o meio aquoso, as microesferas são capazes de libertar as NPP e então a macromolécula terapêutica (24).

As NP-QS podem também ser aplicadas na terapêutica anticancerígena, como sistemas de administração de genes e adjuvantes de vacinas. Devido às características únicas das NP-QS, como a sua elevada biodegradabilidade, biocompatibilidade, permeação celular, capacidade de encapsulação, libertação de fármacos dependente do pH, multifuncionalidade, tempo de residência prolongado na corrente sanguínea, estas surgiram como um dos veículos de administração mais promissores para a terapêutica e diagnóstico do cancro (46).

Os ácidos nucleicos podem ser administrados e transportados até às células tumorais ou ao ambiente circundante, com o objetivo de controlar o gene que se encontra envolvido na patogénese do cancro (164). Contudo, as terapêuticas que envolvem a administração de ácidos nucleicos enfrentam vários desafios durante o direcionamento às células alvo, o que pode restringir os efeitos terapêuticos pretendidos (46). Os principais sistemas destinados à administração de genes consistem em vetores virais ou não virais. Embora os vetores virais

possuam uma transfeção eficiente, as suas características mutagénicas e carcinogénicas limitam muito a sua aplicação na terapia genética do cancro (165). Nos últimos anos, os vetores não virais foram desenvolvidos como uma alternativa viável à nanotecnologia de vetores virais (166). Os lipossomas e as NPP são exemplos de vetores não virais aplicados na administração de genes. Ainda que os lipossomas possuam uma transfeção eficiente e sejam fáceis de produzir, os mesmos apresentam uma reduzida eficiência de encapsulação, toxicidade inespecífica, tempo de semivida curto e estabilidade *in vivo* limitada (167). Neste sentido, os polímeros catiónicos têm sido amplamente utilizados como veículos de genes, visto que têm uma elevada eficiência de transfeção e capacidade de encapsulação (168). O quitosano possui excelentes propriedades físico-químicas que o tornam adequado para a administração de ácidos nucleicos. A interação eletrostática entre o quitosano e os ácidos nucleicos origina rapidamente complexos, microesferas ou nanopartículas (169). Assim sendo, devido às propriedades promissoras do quitosano, este polímero é cada vez mais estudado e procurado como veículo para a administração de genes na terapêutica do cancro (46).

Com o objetivo de aumentar a resposta imunitária às vacinas, os adjuvantes são incluídos nas suas formulações. Todavia, devido ao seu potencial para provocar efeitos secundários, os cientistas procuram adjuvantes seguros e eficazes para o fabrico de vacinas, particularmente na terapêutica do cancro (46). Devido à sua segurança, natureza catiónica, biocompatibilidade e capacidade de ser usado como veículo de antigénios, o quitosano pode ser um excelente adjuvante de vacinas. As suas propriedades imunoestimulantes são conhecidas há mais de vinte anos, contudo, o seu potencial como adjuvante não tóxico, seguro e eficiente no desenvolvimento de vacinas para a terapêutica do cancro e doenças infecciosas, só foi descoberto recentemente (170). O quitosano tem a capacidade de estimular respostas imunitárias humorais e mediadas por células (171). Além disso, possibilita que o antigénio administrado permaneça durante mais tempo no local de interesse, levando a uma melhor atividade imunitária (172). O uso de NP-QS pode, por isso, reduzir o número de doses de vacinação necessárias para a obtenção de uma resposta imunitária. Em suma, o quitosano pode ser considerado um imunoadjuvante seguro e eficiente para vacinas utilizadas no tratamento do cancro, aumentando as respostas imunitárias celulares e humorais (46).

A atividade antibacteriana das NP-QS deve-se às suas interações com a parede celular bacteriana ou com a membrana celular. A interação eletrostática entre os grupos amina do quitosano, com carga positiva, e as membranas celulares das bactérias, com carga negativa, resulta numa alteração da permeabilidade da membrana que, por sua vez, causa o desequilíbrio osmótico e efluxo de substâncias intracelulares, resultando na morte celular. Estas

nanopartículas exibem atividade antibacteriana contra estirpes bacterianas clinicamente patogênicas, como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*, este último considerado o mais suscetível (46).

As NP-QS podem também ser utilizadas no processo de cicatrização de feridas. A diabetes está associada a um processo lento de cicatrização de feridas, que se deve à inflamação induzida pela grande quantidade de mediadores inflamatórios produzidos pelos macrófagos. Assim, torna-se necessário uma abordagem para atenuar a inflamação mediada por estas células no tratamento de feridas diabéticas. Como tal, num estudo foram preparadas NP-QS carregadas com curcumina, e o seu potencial para acelerar a cicatrização de feridas diabéticas foi analisado. As NP-QS proporcionaram uma libertação prolongada da curcumina e uma absorção celular eficiente. Além disso, verificou-se que as NP-QS podem efetivamente diminuir a inflamação no local da ferida e aumentar a angiogénese *in vitro* e *in vivo*. Deste modo, as NP-QS promovem um processo de cicatrização acelerado de feridas diabéticas (Figura 6.6). Por isso, estas nanopartículas podem representar uma estratégia de tratamento promissora para acelerar a cicatrização de feridas diabéticas através da diminuição da inflamação (173).

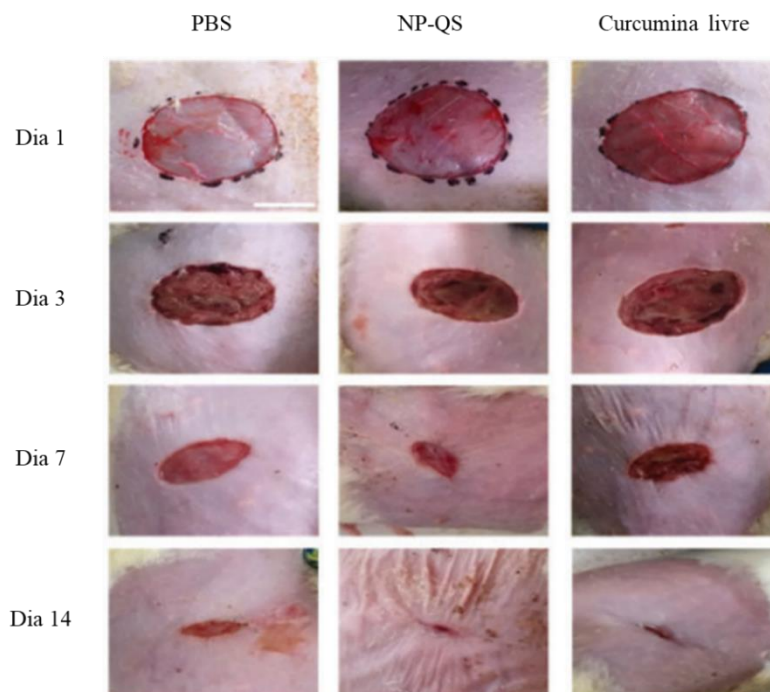


Figura 6.6. Fotografias de feridas diabéticas tratadas com PBS, NP-QS e curcumina livre nos dias 1, 3, 7 e 14. Barra da escala: 1 cm. PBS, solução fosfato salino. *Adaptado de* (173).

6.2. Nanopartículas de ácido hialurónico

À semelhança de outros polímeros, o ácido hialurónico pode formar nanopartículas juntamente com o quitosano (3). Neste sentido, um grupo de trabalho preparou nanopartículas de ácido hialurónico e quitosano (NP-AH/QS), destinadas à administração de genes nas células da córnea e da conjuntiva. As NP-AH/QS, obtidas por gelificação iónica, apresentaram um tamanho entre 100 e 235 nm e um potencial zeta entre -30 e +28 mV. Estes sistemas contendo ADN plasmídeo foram internalizados por endocitose e este processo foi mediado pelos recetores CD44. Os resultados dos estudos de transfeção demonstraram que as NP-AH/QS proporcionam níveis elevados de transfeção (até 15% das células foram transfetadas), sem afetar a viabilidade celular. Estes resultados evidenciam, por isso, o grande potencial das NP-AH/QS como sistemas de administração de genes no tratamento de doenças oculares (174).

O ácido hialurónico foi também usado no desenvolvimento de nanopartículas para a administração oral da insulina. As nanopartículas de ácido hialurónico (NP-AH), de tamanho médio de 182 nm, apresentaram uma elevada capacidade de aprisionamento da insulina (cerca de 95%). Devido à sensibilidade ao pH das NP-AH, este sistema foi capaz de proteger a insulina do pH baixo do estômago. Os resultados demonstraram um aumento de mais de duas vezes no coeficiente de permeabilidade aparente, comparativamente à insulina em solução, e o principal mecanismo de captação da insulina foi o transporte ativo. Por sua vez, os estudos *ex vivo* mostraram que as NP-AH aumentaram significativamente o transporte da insulina através do duodeno e do íleo. Quando administradas por via oral a ratos diabéticos, as NP-AH também apresentaram efeitos hipoglicémicos mais fortes do que a insulina em solução, expondo o seu enorme potencial para a administração oral da insulina (Figura 6.7) (175).

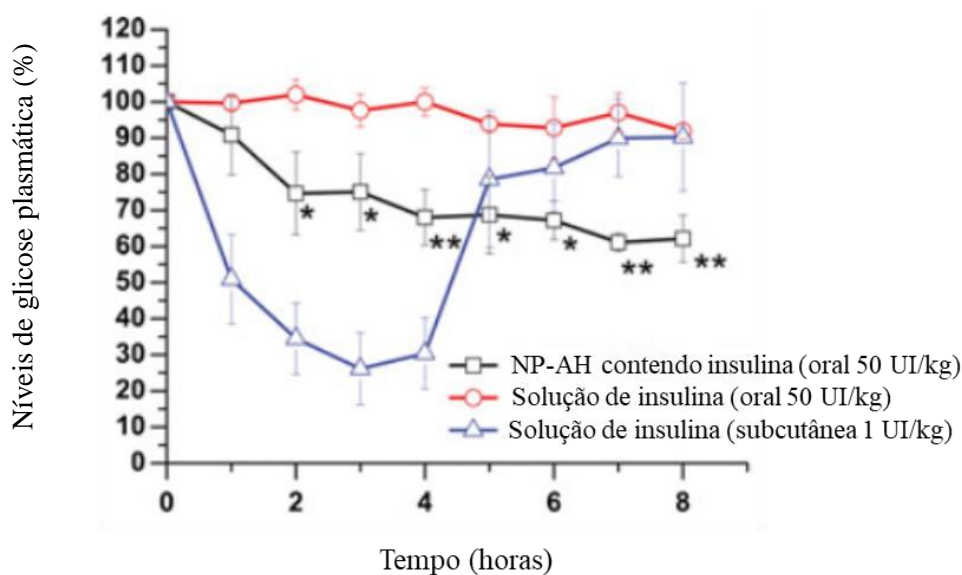


Figura 6.7. Níveis de glicose no sangue em ratos diabéticos, após a administração oral das NP-AH contendo insulina (50 UI/kg), da solução de insulina (50 UI/kg); e a administração subcutânea da solução de insulina (1 UI/kg). Foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as NP-AH contendo insulina comparativamente à solução de insulina (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Os dados representam a média e o desvio padrão ($n = 6$). Adaptado de (175).

6.3. Nanopartículas de sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina, isolado da cartilagem da cabeça do atum, foi usado para o desenvolvimento de nanopartículas baseadas neste polímero e no quitosano (NP-QS/SC). As NP-QS/SC produzidas apresentaram um tamanho de aproximadamente 127 nm, um potencial zeta próximo de -12 mV e uma eficiência de encapsulação da curcumina de cerca de 50%. A libertação deste composto a partir das NP-QS/SC ocorreu principalmente por um mecanismo de difusão, com uma libertação rápida nas primeiras 3 horas, seguida de uma libertação de forma prolongada ao longo de 24 horas (Figura 6.8). Estas nanopartículas também apresentaram atividade antioxidante, que melhorou após a encapsulação da curcumina (Figura 6.9). Com base nestes resultados, os autores sugerem a utilização destes sistemas em aplicações biomédicas. No entanto, as propriedades físico-químicas e biológicas do sulfato de condroitina variam dependendo da sua estrutura, pelo que estes resultados podem não aplicar-se a um polímero isolado de outra fonte marinha (111).

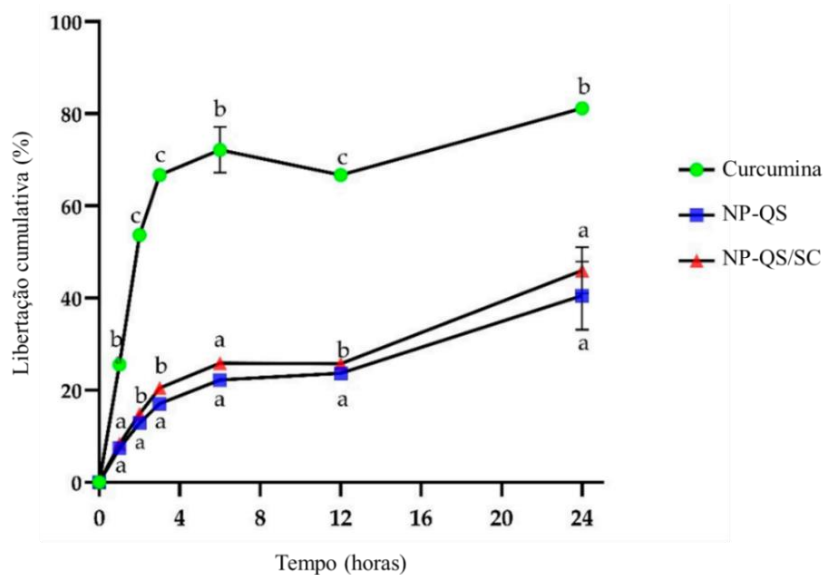


Figura 6.8. Perfil de liberação *in vitro* da curcumina livre e da curcumina encapsulada nas NP-QS e NP-QS/SC, em PBS a pH 6,8. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 3). PBS, solução fosfato salino. Adaptado de (111).

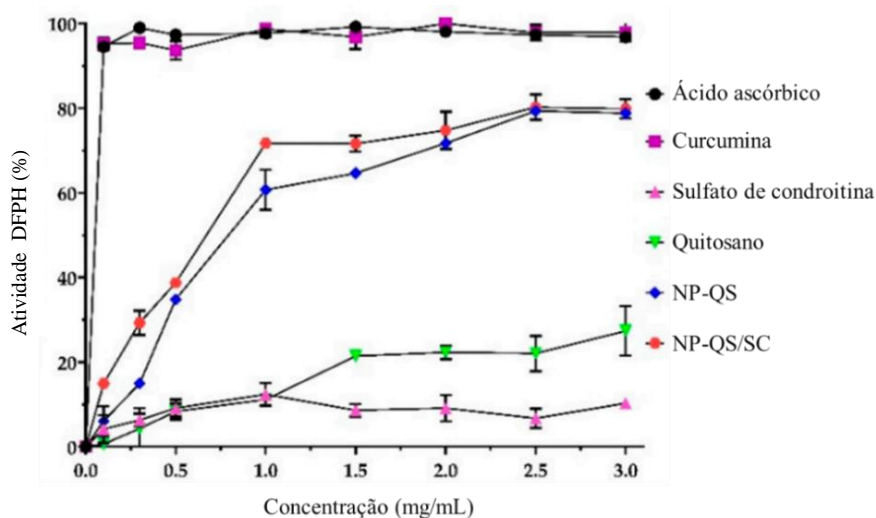


Figura 6.9. Atividade antioxidante da curcumina, do sulfato de condroitina, do quitosano, das NP-QS e das NP-QS/SC, medida através do método DFPH. O ácido ascórbico é utilizado como controlo. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 3). DFPH, método do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila. Adaptado de (111).

6.4. Nanopartículas de carragenina

O método de preparação mais frequentemente utilizado para o desenvolvimento de nanopartículas baseadas na carragenina corresponde à complexação polieletrólítica entre este polímero e o quitosano (4). Todavia, também é referido na literatura a sua complexação com

outros contra iões, como é o caso da protamina, do pululano cationizado, ou ainda a sua complexação direta com fármacos (176–178).

Grenha *et al.* foram um dos primeiros grupos a desenvolver nanopartículas de quitosano e κ -carragenina (NP-QS/ κ -CRG), demonstrando a sua eficácia na encapsulação de proteínas (4). Num dos seus estudos, a macromolécula OVA, utilizada como proteína modelo, foi eficientemente associada às NP-QS/ κ -CRG, conforme foi demonstrado pela caracterização físico-química das mesmas. A complexação polieletrólítica entre os dois polímeros originou nanopartículas com um tamanho de cerca de 600 nm. No ensaio de libertação *in vitro*, as NP-QS/ κ -CRG proporcionaram uma libertação sustentada e controlada da proteína por um período de três semanas, numa solução fosfato salino (PBS) a pH de 7,4 (Figura 6.10). Além disso, as NP-QS/ κ -CRG desenvolvidas exibiram uma reduzida toxicidade em contacto com células semelhantes a fibroblastos (células L929), o que demonstra a sua boa biocompatibilidade e elevada segurança. Em síntese, o perfil de libertação controlado e a ausência de toxicidade tornam estes sistemas de administração potenciais candidatos para muitas aplicações biomédicas, desde sistemas de administração de fármacos a estratégias de engenharia de tecidos (67). No entanto, como o tamanho das NP-QS/ κ -CRG permanecia fora do intervalo ideal para a administração transmucosa, o grupo de investigação adicionou TPF à formulação, para atuar como reticulador e diminuir as dimensões dos sistemas produzidos. Esta estratégia foi bem-sucedida, levando à formação de NP-QS/ κ -CRG com tamanhos em torno de 200 nm e com um potencial zeta fortemente positivo (cerca de +50 mV). Além disso, a adição de TPF dotou as NP-QS/ κ -CRG de maior estabilidade durante o seu período de armazenamento de 9 meses. Concluiu-se que estes nanossistemas podem ser potenciais candidatos para a administração de macromoléculas através da mucosa, devido ao seu reduzido tamanho e elevada carga positiva (179).

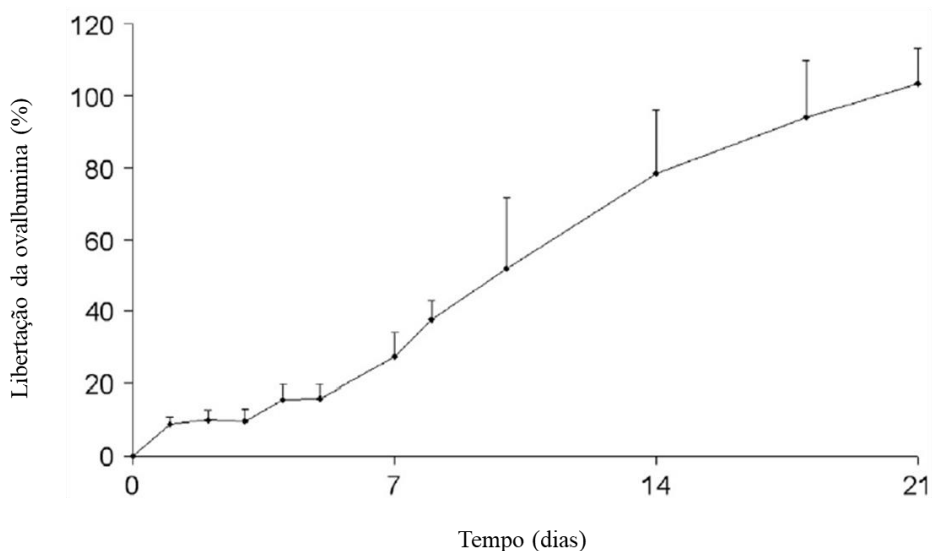


Figura 6.10. Perfil de liberação da OVA a partir das NP-QS/ κ -CRG em PBS a pH de 7,4 e a 37 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n \geq 3$). Adaptado de (67).

O mesmo grupo de investigação, num outro estudo, demonstrou que as nanopartículas de quitosano, κ -carragenina e TPF (NP-QS/ κ -CRG/TPF) funcionam como sistemas de administração adequados para a administração pulmonar e nasal de fármacos e mostrou com particular ênfase o seu potencial de biocompatibilidade. Além da capacidade de associar uma macromolécula modelo, a albumina sérica bovina (BSA), as NP-QS/ κ -CRG/TPF demonstraram ser estáveis na presença de uma quantidade de lisozima que simulou as condições *in vivo*. Estes sistemas também evidenciaram estabilidade após o processo de liofilização, que ocorreu na presença de glicose ou sacarose (utilizados como crioprotetores). As NP-QS/ κ -CRG/TPF carregadas com BSA foram incorporadas com sucesso em microesferas, por meio de um processo de secagem por pulverização, resultando num pó seco com propriedades adequadas para administração pulmonar. Além disso, os nanossistemas produzidos exibiram uma toxicidade reduzida ou insignificante em contacto com duas linhas celulares (células A549 e Calu-3), representativas do epitélio nasal e pulmonar. Esta conclusão é sustentada pelos resultados obtidos por um ensaio de citotoxicidade e pela monitorização da resistência elétrica transepitelial. No ensaio de citotoxicidade, verificou-se a ausência de toxicidade durante uma exposição de 24 horas às NP-QS/ κ -CRG/TPF em concentrações de até 1 mg/mL (Figura 6.11). Estes resultados foram ainda reforçados pela ausência de resposta inflamatória após 24 horas de exposição das células às NP-QS/ κ -CRG/TPF. Em conjunto, estes resultados constata a biocompatibilidade e segurança das NP-QS/ κ -CRG/TPF relativamente à administração nasal e pulmonar, o que as propõe como candidatas adequadas para estas aplicações (180).

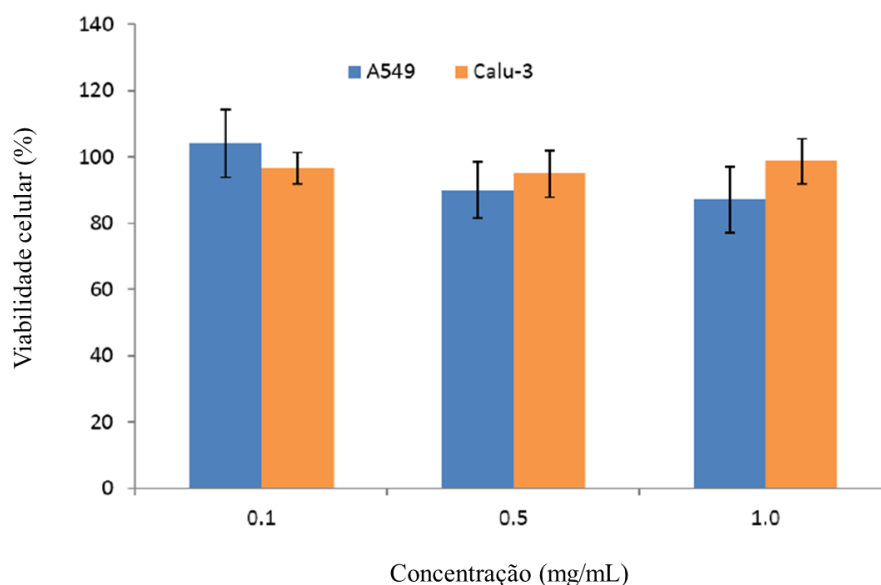


Figura 6.11. Viabilidade celular das linhas celulares Calu-3 e A549 medida pelo ensaio MTT, após exposição durante 24 horas a NP-QS/ κ -CRG/TPF. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 6). MTT, ensaio metil-tiazol-tetrazólio. *Adaptado de (4).*

Num estudo de outro grupo de trabalho, verificou-se a encapsulação da eritropoietina humana recombinante em NP-QS/ κ -CRG com eficiência de 48%. A libertação da eritropoietina ocorreu de forma controlada em PBS a pH de 7,4, com a libertação de aproximadamente 50% num período de duas semanas (181).

Apesar da predominância da complexação polieletrólítica como método de preparação, outras abordagens metodológicas proporcionaram a inclusão da carragenina em nanopartículas, principalmente na forma de material de revestimento (4). Um destes trabalhos consistiu no revestimento de uma nanoemulsão com κ -carragenina. A introdução bem-sucedida da κ -carragenina na superfície da nanoemulsão é considerada uma estratégia para desenvolver nanossistemas sensíveis à temperatura (182).

6.5. Nanopartículas de fucoidano

Também o fucoidano tem sido utilizado como material de matriz no desenvolvimento de nanopartículas e muitas destas formulações foram propostas nos últimos anos para aplicações biomédicas. Mais uma vez, a complexação de polieletrólitos é o método mais utilizado na preparação de nanopartículas baseadas no polímero fucoidano. Este método é

favorecido pela presença dos grupos sulfato na estrutura do fucoidano e utiliza, na maioria dos casos, o quitosano como contra ião (4).

As nanopartículas de quitosano e fucoidano (NP-QS/FUC) sintetizadas mostraram exibir um comportamento sensível ao pH, demonstrado pela libertação sustentada do fármaco curcumina em diferentes soluções tampão (com valores de pH distintos), que simularam o ambiente gastrointestinal. A libertação do fármaco ocorreu com o aumento do pH, especialmente quando a proporção dos polímeros fucoidano/quitosano foi de 1:1 (Figura 6.12). Com base nestes resultados, as NP-QS/FUC foram propostas para a terapêutica anticancerígena oral (183).

A mesma via de administração foi escolhida para a administração de NP-QS/FUC contendo berberina, um alcaloide com atividades antimicrobiana e anti-inflamatória. Neste estudo, o polímero fucoidano foi alvo de alterações estruturais por conjugação com taurina, aumentando, deste modo, o seu carácter aniónico. A berberina foi associada às NP-QS/FUC com uma eficiência de aproximadamente 40% e este sistema foi sugerido como potencial terapêutica para doenças associadas à disfunção epitelial intestinal (184,185).

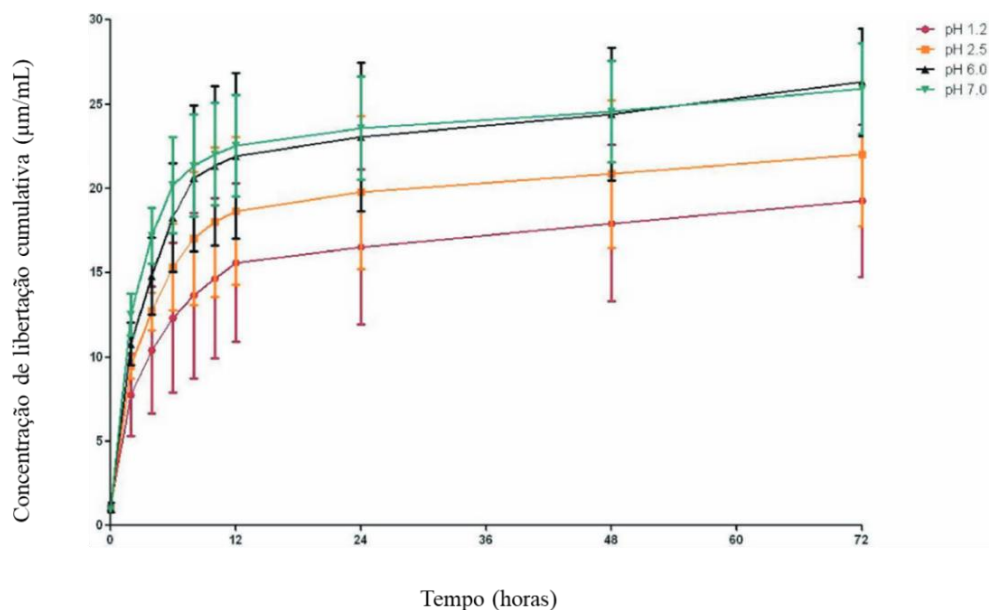


Figura 6.12. Perfil de libertação da curcumina a partir das NP-QS/FUC em ambientes com diferentes valores de pH, de forma a simular o trato gastrointestinal. *Adaptado de* (183).

Outro estudo sugeriu a encapsulação da gentamicina em NP-QS/FUC para administração pulmonar. Neste estudo, a gentamicina foi associada às NP-QS/FUC com uma eficiência de 94% e o antibiótico foi libertado em 99% por um período de 72 horas. Além disso, estes sistemas exibiram um efeito antioxidante altamente potente. De facto, conforme se pode

observar na Figura 6.13, o contacto das células RAW 264.7 com as NP-QS/FUC, após a sua exposição ao lipopolissacarídeo [um conhecido produtor de espécies reativas de oxigénio (ERO)], provocou a diminuição de ERO nos macrófagos. As NP-QS/FUC têm também a capacidade de eliminar o DFPH, o que foi atribuído à sua composição em fucoidano. As nanopartículas desenvolvidas não exerceram efeitos citotóxicos nas células pulmonares e não induziram reações inflamatórias indesejadas (186).

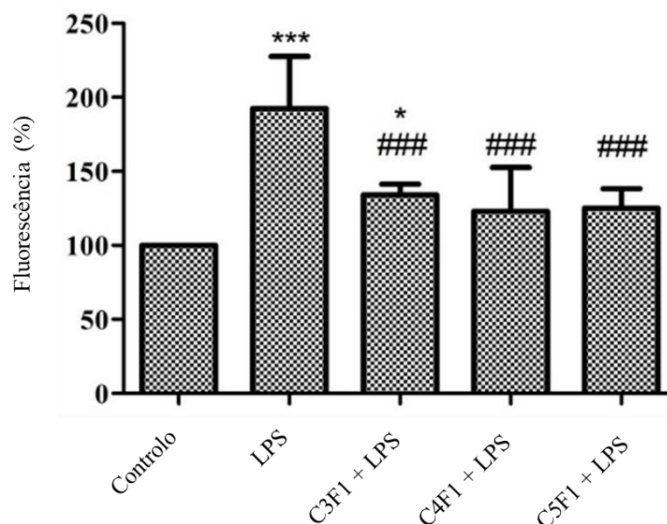


Figura 6.13. Deteção, por citometria de fluxo, da indução das células RAW 264.7 pelo lipopolissacarídeo. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 5). * $p < 0,01$ versus grupo controlo; *** $p < 0,001$ versus grupo controlo; ### $p < 0,001$ versus grupo LPS. LPS, lipopolissacarídeo. Adaptado de (186).

A aplicação de NP-QS/FUC como transportadoras do fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF) foi proposta para uma estratégia de regeneração nervosa, uma vez que o bFGF detém um efeito bastante benéfico na angiogénese e na sobrevivência das células neuronais. A eficiência de encapsulação do bFGF rondou em torno de 80 a 90%. As NP-QS/FUC proporcionam uma liberação controlada da proteína, altamente dependente da razão QS/FUC. Tal como se observou para a curcumina, um maior controlo da libertação foi obtido para razões de 1/1, que correspondeu a uma libertação contínua do bFGF durante 4 dias. Este trabalho demonstrou também que as NP-QS/FUC possibilitaram a proteção do bFGF contra o calor e a desativação enzimática, e ainda a diminuição da quantidade do fator de crescimento necessário para o crescimento de neurites. Um ensaio de citotoxicidade realizado numa linha celular evidenciou a ausência de toxicidade até 72 horas, o que se deveu, possivelmente, à reduzida concentração de nanopartículas utilizadas no estudo (187).

Ainda no contexto da medicina regenerativa, nanopartículas de quitosano, TPF e fucoidano (NP-QS/TPF/FUC) foram descritas para a administração do fator 1 derivado de células estromais (SDF-1), uma quimiocina importante no processo de mobilização de células-tronco. Neste estudo, a proteína foi associada às NP-QS/TPF/FUC com uma eficiência entre 60 e 68%. O perfil de libertação em PBS a pH de 7,4 foi favorável, com uma libertação de 20% nas primeiras 12 horas, seguido de uma libertação de forma prolongada de 30% durante um período de 7 dias. O SDF-1 libertado evidenciou maior atividade mitogénica em comparação com o SDF-1 livre. De facto, as células-tronco mesenquimais (MSC) apresentaram um crescimento muito mais intenso após 1 ou 3 dias de incubação com as NP-QS/TPF/FUC. Para além disso, ocorreu uma migração das MSC em resposta à libertação prolongada do SDF-1 (Figura 6.14). Estes transportadores foram também importantes na proteção do SDF-1 contra a proteólise e tratamento térmico, fornecendo os meios para superar algumas das principais desvantagens desta proteína, que são o seu tempo em circulação curto e a sua fácil degradação enzimática. Como tal, os sistemas de administração de origem marinha apresentaram resultados promissores na administração desta quimiocina para a regeneração de tecidos (188).

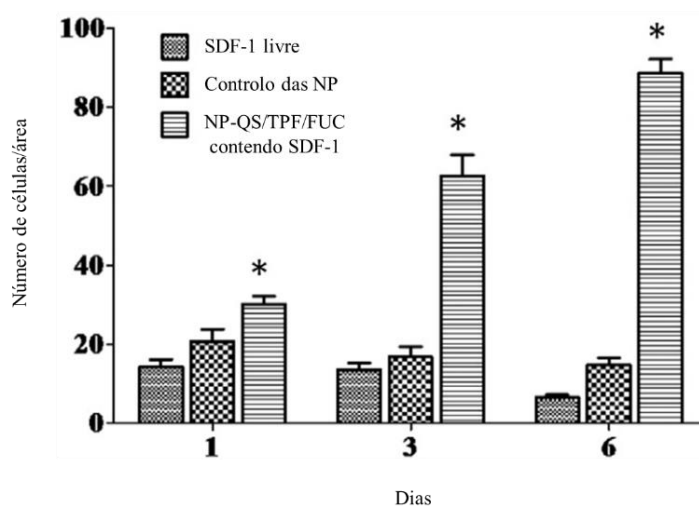


Figura 6.14. Número médio de MSC que migraram num ensaio de migração celular. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n = 3$). * $p < 0,05$ versus grupo SDF-1 livre. NP, nanopartículas. Adaptado de (188).

Devido às propriedades de mucoadesão e de aumento da absorção associadas ao derivado do quitosano, o trimetilquitosano e, ainda, aos efeitos hipoglicémicos do fucoidano, um grupo de investigação desenvolveu nanopartículas de trimetilquitosano e fucoidano (NP-TMQS/FUC) multifuncionais com o objetivo de administrar insulina por via oral. As NP-

TMQS/FUC desenvolvidas protegeram a insulina contra a degradação e a sua libertação foi dependente do pH nos fluidos do trato gastrointestinal (Figura 6.15A). Estas nanopartículas permitiram o aumento do transporte paracelular da insulina através da barreira intestinal (Figura 6.15B) e exibiram também uma atividade inibitória da α -glicosidase (Figura 6.15C). Os autores deste estudo esperam que o aumento da absorção das NP-TMQS/FUC observado, juntamente com o efeito biológico do fucoidano na regulação dos níveis glicémicos, possa avançar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas multifuncionais para a diabetes (189).

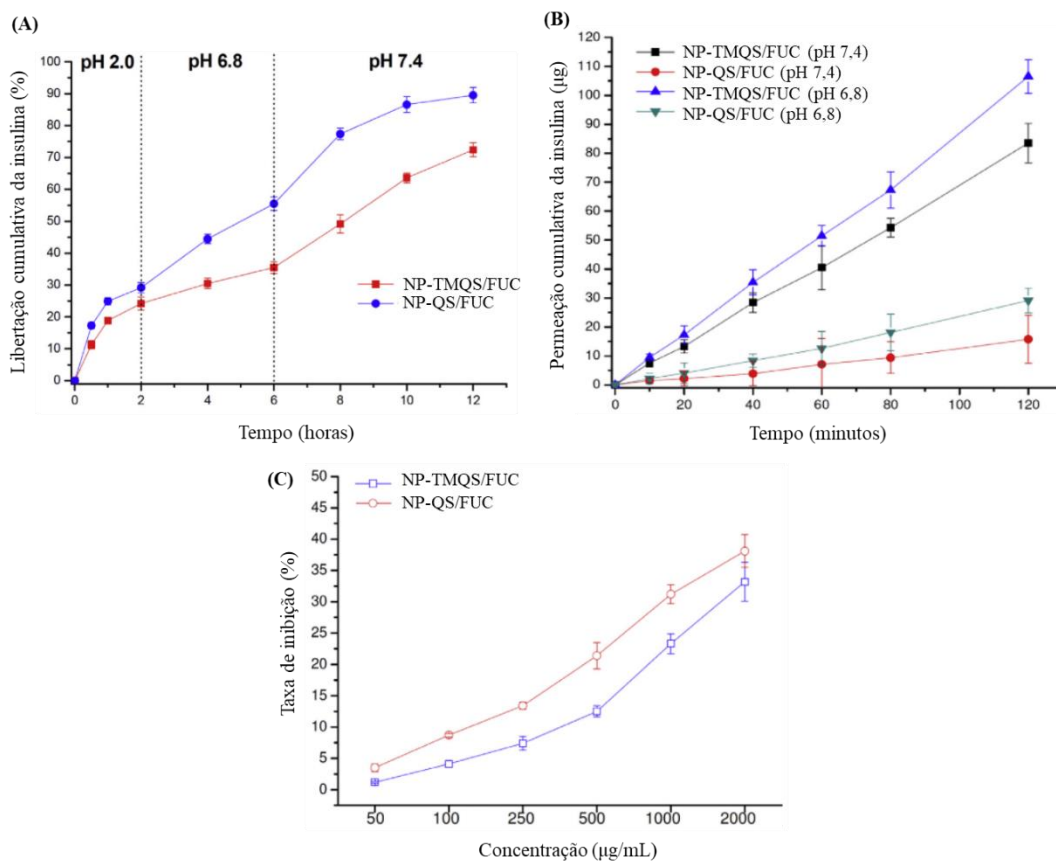


Figura 6.15. (A) Perfil de libertação da insulina a pH 2,0, 6,8 e 7,4; (B) Efeito das NP-TMQS/FUC e NP-QS/FUC na permeação da insulina; (C) Efeito inibitório da α -glicosidase pelas NP-TMQS/FUC e NP-QS/FUC. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 3). Adaptado de (189).

Outros trabalhos interessantes descreveram a preparação de NP-FUC por outros métodos que não envolveram a complexação com uma molécula de carga oposta (4). Por exemplo, um fucoidano acetilado originou, por um processo de diálise, NP-FUC contendo DOX. A libertação do fármaco seguiu uma cinética de primeira ordem durante 5 dias. Os macrófagos tratados com as NP-FUC expressaram uma elevada quantidade de citocinas

antitumorais, como é exemplo o fator de necrose tumoral alfa e o fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (190).

O fucoidano foi também estudado e utilizado como material de revestimento de nanopartículas constituídas por outros materiais, com diferentes objetivos (4). O revestimento de nanopartículas de ferro com fucoidano melhorou a afinidade destas com as plaquetas, o que permitiu a visualização, por ressonância magnética, de trombos com grande quantidade de plaquetas na sua constituição (191). Também as nanopartículas de poli(isobutil cianoacrilato), após revestimento com fucoidano, apresentaram uma melhor captação celular por macrófagos e fibroblastos (192).

6.6. Nanopartículas de alginato

As propriedades do alginato tornam este polímero apropriado para o desenvolvimento de NPP. Uma vez que o alginato possui carga negativa, pode interagir com o quitosano de carga positiva, levando à formação de nanopartículas. Além disso, ao contrário do quitosano, o alginato dissolve-se em valores de pH mais altos. Deste modo, a formação de complexos polieletrólitos entre estes dois polímeros pode ser uma estratégia interessante para superar as limitações de cada polímero individual (154).

Neste contexto, um estudo teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas de quitosano e alginato, revestidas com quitosano (NP-QS/ALG/QS) e carregadas com 5-FU para uma administração oftálmica. As NP-QS/ALG/QS apresentaram uma liberação sustentada do 5-FU em comparação com a solução de 5-FU. Também o estudo *in vivo* no olho de coelho demonstrou níveis superiores de 5-FU no humor aquoso em comparação com a solução de 5-FU (Figura 6.16). As propriedades de mucodesão foram melhoradas com o revestimento com quitosano, resultando numa maior biodisponibilidade em comparação com as nanopartículas não revestidas. Além disso, as NP-QS/ALG/QS não provocaram irritação e foram bem toleradas pelo olho de coelho. Os resultados desta investigação incentivam a realização de estudos clínicos sobre esta formulação e a sua otimização como colírio, de modo a minimizar a dose aplicada e a frequência de dosagem em contraste com o 5-FU administrado convencionalmente (193).

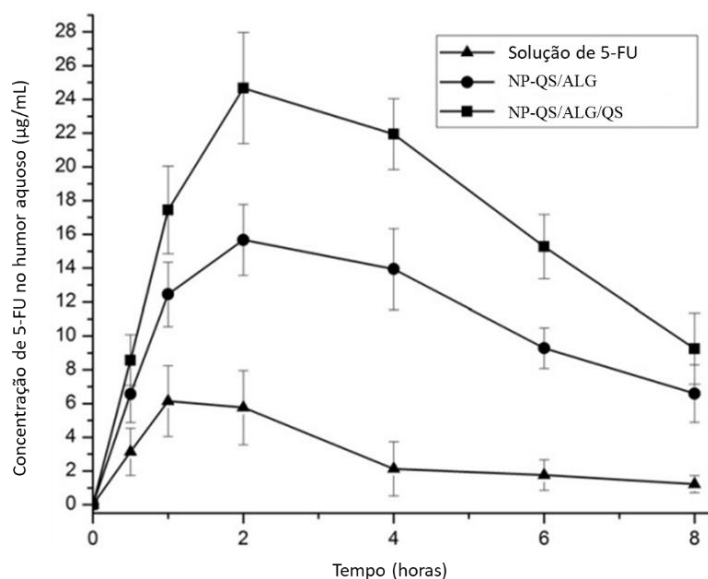


Figura 6.16. Concentração do 5-FU *in vivo* obtida com uma solução de 5-FU, com as NP-QG/ALG/QS e com as nanopartículas sem revestimento. NP-QS/ALG, nanopartículas de quitosano e alginato sem revestimento com quitosano. *Adaptado de* (193).

Outro estudo envolveu a preparação de nanopartículas de quitosano e alginato (NP-QS/ALG) para a encapsulação do fármaco DOX. As NP-QS/ALG, obtidas por um método de gelificação iónica, apresentaram uma maior taxa de eficiência de encapsulação (95%), comparativamente às NP-QS carregadas com o mesmo fármaco. O perfil de libertação *in vitro* da DOX caracterizou-se por uma primeira fase de libertação rápida, seguido por uma fase de libertação gradual e sustentada. O estudo de citotoxicidade na linha celular do cancro da mama humano, MCF-7, revelou que a DOX encapsulada em nanopartículas exibiu um potente efeito citotóxico, comparativamente à DOX livre (Figura 6.17). Além disso, de acordo com estes resultados de citotoxicidade, as NP-QS/ALG foram mais citotóxicas que as NP-QS (194).

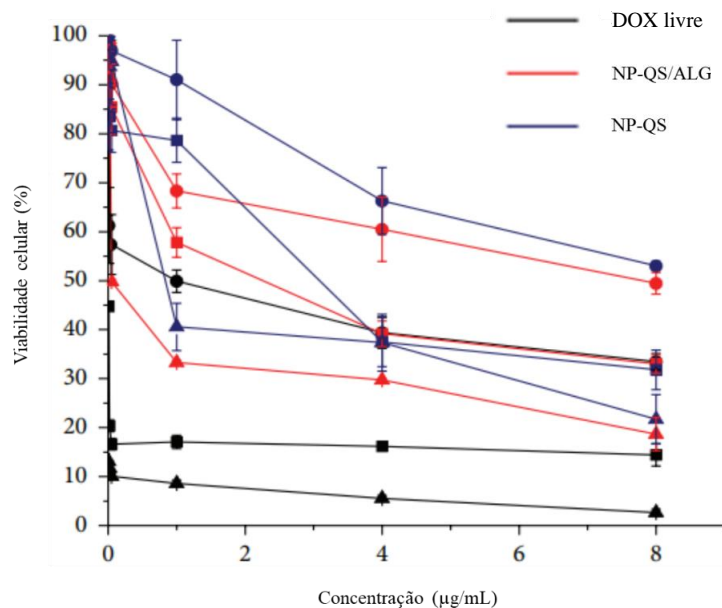


Figura 6.17. Citotoxicidade da DOX livre, da DOX encapsulada nas NP-QS/ALG e nas NP-QS, em células MCF-7 após ●24, ■48, e ▲72 horas de tratamento. A sobrevivência celular foi avaliada através do ensaio de sulforodamina B. Os dados representam a média e o desvio padrão (n = 4). *Adaptado de* (194).

6.7. Nanopartículas de colagénio

O colagénio de origem marinha também possui um papel promissor no desenvolvimento de NPP. Neste cenário, a administração transdérmica do estradiol como terapêutica de reposição hormonal apresenta vantagens sobre a sua administração oral, pois evita o metabolismo pré-sistémico hepático. Como tal, um estudo teve como objetivo o desenvolvimento de nanopartículas de colagénio (NP-CG), isolado da *Chondrosia reniformis*, para a administração transdérmica do 17 β -estradiol-hemihidratado como terapêutica de reposição hormonal. O fármaco em estudo foi adsorvido à superfície das NP-CG, após o qual as NP-CG foram incorporadas num hidrogel. A administração transdérmica deste sistema foi comparada com a de um gel comercial sem NP-CG. As amostras de saliva de pacientes no pós-menopausa apresentaram níveis de estradiol significativamente maiores após aplicação do hidrogel com as NP-CG. O hidrogel constituído pelas NP-CG apresentou uma área sob a curva, ao longo de 24 horas, duas a três vezes maior, e os níveis de estradiol 24 horas após a sua administração foram pelo menos duas vezes maior, comparativamente ao gel comercial (Tabela 6.1). Além disso, o hidrogel com as NP-CG permitiu uma libertação prolongada do estradiol em comparação com o gel comercial e proporcionou uma melhor absorção do estradiol. Assim sendo, as NP-CG representam sistemas de administração promissores para a via transdérmica (195).

Tabela 6.1. Comparação das áreas sob a curva do paciente 1 ao paciente 5, após aplicação de 0,75 mg em dose única de estradiol na forma de hidrogel contendo NP-CG ou na forma de um gel comercial (Gynokadin®). AUC, área sob a curva. *Adaptado de* (195).

	Hidrogel com as NP-CG	Gel comercial
AUC⁰⁻²⁴ (pg × h/mL) Paciente 1	63120	26980
AUC⁰⁻²⁴ (pg × h/mL) Paciente 2	25011	7292
AUC⁰⁻²⁴ (pg × h/mL) Paciente 3	22095	4323
AUC⁰⁻¹⁰ (pg × h/mL) Paciente 4	11405	6267
AUC⁰⁻¹⁰ (pg × h/mL) Paciente 5	2692	863

7. Conclusão e perspectivas futuras

Os fármacos não são, normalmente, administrados na sua forma livre, mas sim como parte de uma forma farmacêutica, no qual são combinados com excipientes. Estes excipientes podem funcionar como sistemas de administração inertes, ou podem deter propriedades multifuncionais, sendo estes últimos cada vez mais utilizados pela indústria farmacêutica.

A nanotecnologia tem sido alvo de um crescimento científico em diversas áreas de investigação, nomeadamente na área farmacêutica. O seu papel é particularmente importante na administração de fármacos, visto que os sistemas de administração nanotecnológicos permitem solucionar alguns problemas relacionados com as formas farmacêuticas convencionais. De entre os sistemas de administração nanotecnológicos, as NPP funcionam como ótimos veículos para a administração de fármacos, uma vez que possuem uma elevada eficiência de encapsulação de fármacos, alta estabilidade nos fluídos biológicos, possibilidade de administração por várias vias, adaptação do tamanho e características da superfície e, ainda, a possibilidade de promover uma libertação controlada e sustentada do fármaco em locais específicos. As NPP podem ser produzidos a partir de uma variedade de polímeros, quer de origem sintética ou natural, sendo estes últimos os preferenciais.

A maior parte da superfície do planeta é coberta por oceanos, pelo que o ambiente marinho e a sua ampla diversidade de organismos oferecem uma enorme fonte de materiais naturais com potenciais na área farmacêutica. De entre os biomateriais, os polímeros marinhos e os seus derivados têm sido propostos para o desenvolvimento de sistemas de administração de fármacos, nomeadamente de NPP, tirando partido do seu elevado potencial de biocompatibilidade, biodegradabilidade, reduzida toxicidade e imunogenicidade e das várias propriedades biológicas que lhe estão associadas. Além disso, estes polímeros são económicos, uma vez que existem em grande abundância na natureza.

De acordo com os diversos estudos apresentados, as nanopartículas baseadas em polímeros de origem marinha apresentaram resultados promissores para a administração de fármacos, cicatrização de feridas e regeneração de tecidos. Estes sistemas nanotecnológicos permitem a veiculação de diversas substâncias, como pequenas moléculas, proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos. Além disso, possibilitam a proteção de fármacos da sua degradação no ambiente biológico, o que é particularmente relevante para fármacos lábeis. Os polímeros de origem marinha proporcionam uma libertação controlada e prolongada de fármacos, visando melhorar a segurança e eficácia terapêutica. A sua estrutura polimérica torna possível a realização de modificações químicas, sendo estas benéficas para a melhoria de algumas

propriedades dos polímeros ou para os direcionar para células alvo. Com bases nos resultados descritos, o quitosano é de facto o polímero marinho mais utilizado no desenvolvimento de NPP, devido às suas propriedades mucoadesivas e à sua capacidade de abertura transitória das junções celulares estreitas. Assim sendo, é possibilitada a administração de fármacos por vias mucosas, como a via oral, nasal e pulmonar, melhorando a adesão do doente à terapêutica. Para além disso, a sua carga superficial positiva permite-lhe interagir ostaticamente com polímeros marinhos com carga negativa, levando à formação de NPP. A combinação de polímeros marinhos diferentes na mesma nanopartícula, torna possível a combinação das suas propriedades e, por sua vez, a melhoria da eficácia terapêutica.

Os resultados apresentados nos ensaios de toxicidade associada à administração de nanopartículas baseadas em polímeros de origem marinha revelam que estes sistemas são seguros. Contudo, serão necessários no futuro ensaios de toxicidade a longo prazo de forma a avaliar a possibilidade da utilização de polímeros marinhos em sistema de administração nanotecnológicos para a prática clínica.

Referências bibliográficas

1. Barbosa AI, Coutinho AJ, Lima SAC, Reis S. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: fucoidan and chitosan as key players in the drug delivery match field. *Mar Drugs*. 2019;17(12):654.
2. Zhang H, Wu X, Quan L, Ao Q. Characteristics of marine biomaterials and their applications in biomedicine. *Mar Drugs*. 2022;20(6):372.
3. Cardoso MJ, Costa RR, Mano JF. Marine origin polysaccharides in drug delivery systems. *Mar Drugs*. 2016;14(2):34.
4. Cunha L, Grenha A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. *Mar Drugs*. 2016;14(3):42.
5. Silva TH, Alves A, Ferreira BM, Oliveira JM, Reys LL, Ferreira RJF, et al. Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *Int Mater Rev*. 2012;57(5):276–306.
6. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules*. 2019;25(1):112.
7. Antonio JR, Antônio CR, Cardeal ILS, Ballavenuto JMA, Oliveira JR. Nanotechnology in dermatology. *An Bras Dermatol*. 2014;89(1):126–136.
8. Viegas C, Pereira DSM, Fonte P. Insights into nanomedicine for head and neck cancer diagnosis and treatment. *Materials*. 2022;15(6):2086.
9. Whatmore RW. Nanotechnology—what is it? Should we be worried? *Occup Med*. 2006;56(5):295–299.
10. Boulaiz H, Alvarez PJ, Ramirez A, Marchal JA, Prados J, Rodríguez-Serrano F, et al. Nanomedicine: application areas and development prospects. *Int J Mol Sci*. 2011;12(5):3303–3321.
11. Castro-Pastrana LI, Angulo Molina A, Flood-Garibay JA, Quintana-Romero DA, Crespo-Morán P, Méndez-Rojas MÁ. Recent advances on nanostructured materials for drug delivery and release. In: *Nanopharmaceuticals: Principles and Applications*. 2021. p. 319–360.
12. Sim S, Wong NK. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomed Rep*. 2021;14(5):42.
13. Ventola CL. The nanomedicine revolution, part 2: current future clinical applications. *P&T*. 2012;37(10):582–591.
14. Mazayen ZM, Ghoneim AM, Elbatany RS, Basalious EB, Bendas ER. Pharmaceutical nanotechnology: from the bench to the market. *Futur J Pharm Sci*. 2022;8(1):12.
15. Rizzo LY, Theek B, Storm G, Kiessling F, Lammers T. Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2013;24(6):1159–1166.
16. Halwani AA. Development of pharmaceutical nanomedicines: from the bench to the market. *Pharmaceutics*. 2022;14(1):106.
17. Zhang X, Zhang H, Wu Z, Wang Z, Niu H, Li C. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;68(3):526–534.
18. Chen G, Roy I, Yang C, Prasad PN. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. *Chem Rev*. 2016;116(5):2826–2885.
19. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Control Release*. 2015;200:138–157.

20. Tran S, DeGiovanni P, Piel B, Rai P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. *Clin Transl Med.* 2017;6(1):44.
21. Bregoli L, Movia D, Gavigan-Imedio JD, Lysaght J, Reynolds J, Prina-Mello A. Nanomedicine applied to translational oncology: A future perspective on cancer treatment. *Nanomedicine.* 2016;12(1):81–103.
22. Dube A, Nicolazzo JA, Larson I. Chitosan nanoparticles enhance the intestinal absorption of the green tea catechins (+)-catechin and (–)-epigallocatechin gallate. *Eur J Pharm Sci.* 2010;41(2):219–225.
23. Gonzalez-Valdivieso J, Girotti A, Schneider J, Arias FJ. Advanced nanomedicine and cancer: Challenges and opportunities in clinical translation. *Int J Pharm.* 2021;599:120438.
24. Braz L, Dionísio M, Grenha A. Chitosan-based nanocarriers: effective vehicles for mucosal protein delivery. In: *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage.* New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011. p. 365–412.
25. Wang R, Billone PS, Mullett WM. Nanomedicine in action: an overview of cancer nanomedicine on the market and in clinical trials. *J Nanomater.* 2013;2013:1–12.
26. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine concepts. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2434–2443.
27. Wu LP, Wang D, Li Z. Grand challenges in nanomedicine. *Mater Sci Eng C.* 2020;106:110302.
28. Viegas C, Patrício AB, Prata J, Fonseca L, Macedo AS, Duarte SOD, et al. Advances in pancreatic cancer treatment by nano-based drug delivery systems. *Pharmaceutics.* 2023;15(9):2363.
29. Navya PN, Kaphle A, Srinivas SP, Bhargava SK, Rotello VM, Daima HK. Current trends and challenges in cancer management and therapy using designer nanomaterials. *Nano Converg.* 2019;6(1):1–30.
30. Chenthamara D, Subramaniam S, Ramakrishnan SG, Krishnaswamy S, Essa MM, Lin FH, et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res.* 2019;23(1):1–29.
31. Rabanel JM, Aoun V, Elkin I, Mokhtar M, Hildgen P. Drug-loaded nanocarriers: passive targeting and crossing of biological barriers. *Curr Med Chem.* 2012;19(19):3070–3102.
32. Zhao Z, Ukidve A, Krishnan V, Mitragotri S. Effect of physicochemical and surface properties on in vivo fate of drug nanocarriers. *Adv Drug Deliv Rev.* 2019;143:3–21.
33. Yetisgin AA, Cetinel S, Zuvin M, Kosar A, Kutlu O. Therapeutic nanoparticles and their targeted delivery applications. *Molecules.* 2020;25(9):2193.
34. Zhang A, Meng K, Liu Y, Pan Y, Qu W, Chen D, et al. Absorption, distribution, metabolism, and excretion of nanocarriers in vivo and their influences. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020;284:102261.
35. Caban S, Aytekin E, Sahin A, Capan Y. Nanosystems for drug delivery. *Drug Deliv.* 2014;2(1):1–7.
36. Attia MF, Anton N, Wallyn J, Omran Z, Vandamme TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *J Pharm Pharmacol.* 2019;71(8):1185–1198.
37. Yao Y, Zhou Y, Liu L, Xu Y, Chen Q, Wang Y, et al. Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. *Front Mol Biosci.* 2020;7:193.
38. Jain A, Jain SK. In vitro and cell uptake studies for targeting of ligand anchored nanoparticles for colon tumors. *Eur J Pharm Sci.* 2008;35(5):404–416.

39. Yousefpour P, Atyabi F, Vasheghani-Farahani E, Movahedi AAM, Dinarvand rassoul. Targeted delivery of doxorubicin-utilizing chitosan nanoparticles surface-functionalized with anti-her2 trastuzumab. *Int J Nanomedicine*. 2011;6:1977–1990.
40. Din FU, Aman W, Ullah I, Qureshi OS, Mustapha O, Shafique S, et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:7291–7309.
41. Wang EC, Wang AZ. Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology. *Integr Biol*. 2014;6(1):9–26.
42. Tenchov R, Bird R, Curtze AE, Zhou Q. Lipid nanoparticles - from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement. *ACS Nano*. 2021;15(11):16982–17015.
43. Lombardo D, Kiselev MA, Caccamo MT. Smart nanoparticles for drug delivery application: development of versatile nanocarrier platforms in biotechnology and nanomedicine. *J Nanomater*. 2019;2019:26.
44. Chamundeeswari M, Jeslin J, Verma ML. Nanocarriers for drug delivery applications. *Environ Chem Lett*. 2019;17(2):849–865.
45. Soares DCF, Domingues SC, Viana DB, Tebaldi ML. Polymer-hybrid nanoparticles: current advances in biomedical applications. *Biomed Pharmacother*. 2020;131:110695.
46. Bashir SM, Ahmed Rather G, Patrício A, Haq Z, Sheikh AA, Shah MZ ul H, et al. Chitosan nanoparticles: a versatile platform for biomedical applications. *Materials*. 2022;15(19):6521.
47. Fonte P, Nogueira T, Gehm C, Ferreira D, Sarmento B. Chitosan-coated solid lipid nanoparticles enhance the oral absorption of insulin. *Drug Deliv Transl Res*. 2011;1(4):299–304.
48. Rao JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Prog Polym Sci*. 2011;36(7):887–913.
49. Gagliardi A, Giuliano E, Venkateswararao E, Fresta M, Bulotta S, Awasthi V, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Front Pharmacol*. 2021;12:601626.
50. Crucho CIC, Barros MT. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. *Mater Sci Eng C*. 2017;80:771–784.
51. Zielinska A, Carreiró F, Oliveira AM, Neves A, Pires B, Nagasamy Venkatesh D, et al. Polymeric nanoparticles: production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules*. 2020;25(16):3731.
52. Vauthier C, Bouchemal K. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharm Res*. 2009;26(5):1025–1058.
53. Lu XY, Wu DC, Li ZJ, Chen GQ. Polymer nanoparticles. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2011;104:299–323.
54. Pereira P, Carvalho V, Ramos R, Gama M. Chitosan nanoparticles for biomedical applications. In: *Chitosan: Manufacture, Properties, Usage*. New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011. p. 321–363.
55. Ohya Y, Shiratani M, Kobayashi H, Ouchi T. Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity. *Pure Appl Chem*. 1994;31(5):629–642.
56. Grenha A. Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods. *J Drug Target*. 2012;20(4):291–300.
57. Chan HK, Kwok PCL. Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach. *Adv Drug Deliv Rev*. 2011;63(6):406–416.
58. Hiroyuki Tokumitsu, Hideki Ichikawa, Yoshinobu Fukumori. Chitosan-gadopentetic acid complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer:

- preparation by novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization. *Pharm Res.* 1999;16(12):1830–1835.
59. Tokumitsu H, Ichikawa H, Fukumori Y, Block Lawrence H. Preparation of gadopentetic acid-loaded chitosan microparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer by a novel emulsion-droplet coalescence technique. *Chem Pharm Bull.* 1999;47(6):838–842.
 60. El-Shabouri MH. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *Int J Pharm.* 2002;249(1-2):101–108.
 61. Banerjee T, Mitra S, Singh AK, Sharma RK, Maitra A. Preparation, characterization and biodistribution of ultrafine chitosan nanoparticles. *Int J Pharm.* 2002;243(1-2):93–105.
 62. Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, Maitra AN. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J Control Release.* 2001;74(1-3):317–323.
 63. Calvo P, Remunán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J Appl Polym Sci.* 1997;63(1):125–132.
 64. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):83–99.
 65. Sarmiento B, Ribeiro A, Veiga F, Ferreira D. Development and characterization of new insulin containing polysaccharide nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2006;53(2):193–202.
 66. Sarmiento B, Martins S, Ribeiro A, Veiga F, Neufeld R, Ferreira D. Development and comparison of different nanoparticulate polyelectrolyte complexes as insulin carriers. *Int J Pept Res Ther.* 2006;12(2):131–138.
 67. Grenha A, Gomes ME, Rodrigues M, Santo VE, Mano JF, Neves NM, et al. Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(4):1265–1272.
 68. Hu Y, Jiang X, Ding Y, Ge H, Yuan Y, Yang C. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. *Biomaterials.* 2002;23(15):3193–3201.
 69. Avadi MR, Sadeghi AMM, Mohammadpour N, Abedin S, Atyabi F, Dinarvand R, et al. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine.* 2010;6(1):58–63.
 70. Lin YH, Mi FL, Chen CT, Chang WC, Peng SF, Liang HF, et al. Preparation and characterization of nanoparticles shelled with chitosan for oral insulin delivery. *Biomacromolecules.* 2007;8(1):146–152.
 71. Lin YH, Sonaje K, Lin KM, Juang JH, Mi FL, Yang HW, et al. Multi-ion-crosslinked nanoparticles with pH-responsive characteristics for oral delivery of protein drugs. *J Control Release.* 2008;132(2):141–149.
 72. Bayat A, Larijani B, Ahmadian S, Junginger HE, Rafiee-Tehrani M. Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and its quaternized derivatives. *Nanomedicine.* 2008;4(2):115–120.
 73. Erbacher P, Zou S, Bettinger T, Steffan AM, Remy JS. Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability. *Pharm Res.* 1998;15(9):1332–1339.
 74. Sajeesh S, Sharma CP. Novel pH responsive polymethacrylic acid-chitosan-polyethylene glycol nanoparticles for oral peptide delivery. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;76(2):298–305.
 75. Sajeesh S, Sharma CP. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int J Pharm.* 2006;325(1-2):147–154.

76. Berthold A, Cremer K, Kreuter J. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. *J Control Release*. 1996;39(1):17–25.
77. Abd Ellah NH, Abouelmagd SA. Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges. *Expert Opin Drug Deliv*. 2017;14(2):201–214.
78. Sheng Y, Liu C, Yuan Y, Tao X, Yang F, Shan X, et al. Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan. *Biomaterials*. 2009;30(12):2340–2348.
79. Castro KC de, Costa JM, Campos MGN. Drug-loaded polymeric nanoparticles: a review. *Int J Polym Mater*. 2020;71(1):1–13.
80. George A, Shah PA, Shrivastav PS. Natural biodegradable polymers based nano-formulations for drug delivery: A review. *Int J Pharm*. 2019;561:244–264.
81. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR, Rudzinski WE. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J Control Release*. 2001;70(1-2):1–20.
82. Kumari A, Yadav SK, Yadav SC. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2010;75(1):1–18.
83. Kamaly N, Yameen B, Wu J, Farokhzad OC. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release. *Chem Rev*. 2016;116(4):2602–2663.
84. Park JS, Han TH, Lee KY, Han SS, Hwang JJ, Moon DH, et al. N-acetyl histidine-conjugated glycol chitosan self-assembled nanoparticles for intracytoplasmic delivery of drugs: Endocytosis, exocytosis and drug release. *J Control Release*. 2006;115(1):37–45.
85. Sur S, Rathore A, Dave V, Reddy KR, Chouhan RS, Sadhu V. Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. *Nano-Struct. Nano-Objects*. 2019;20:100397.
86. Begines B, Ortiz T, Pérez-Aranda M, Martínez G, Merinero M, Argüelles-Arias F, et al. Polymeric nanoparticles for drug delivery: recent developments and future prospects. *Nanomaterials*. 2020;10(7):1403.
87. Santos MA, Grenha A. Polysaccharide nanoparticles for protein and peptide delivery: exploring less-known materials. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2015;98:223–261.
88. Calzoni E, Cesaretti A, Polchi A, Di Michele A, Tancini B, Emiliani C. Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *J Funct Biomater*. 2019;10(1):4.
89. Campos E, Branquinho J, Carreira AS, Carvalho A, Coimbra P, Ferreira P, et al. Designing polymeric microparticles for biomedical and industrial applications. *Eur Polym J*. 2013;49(8):2005–2021.
90. Wong KH, Lu A, Chen X, Yang Z. Natural ingredient-based polymeric nanoparticles for cancer treatment. *Molecules*. 2020;25(16):3620.
91. Karlsson J, Vaughan HJ, Green JJ. Biodegradable polymeric nanoparticles for therapeutic cancer treatments. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2018;9:105–127.
92. Uhrich KE, Cannizzaro SM, Langer RS, Shakesheff KM. Polymeric systems for controlled drug release. *Chem Rev*. 1999;99(11):3181–3198.
93. Claverie M, McReynolds C, Petitpas A, Thomas M, Fernandes SCM. Marine-derived polymeric materials and biomimetics: an overview. *Polymers*. 2020;12(5):1002.
94. Venkatesan J, Anil S, Kim SK, Shim MS. Seaweed polysaccharide-based nanoparticles: preparation and applications for drug delivery. *Polymers*. 2016;8(2):30.
95. Sun Y, Ma X, Hu H. Marine polysaccharides as a versatile biomass for the construction of nano drug delivery systems. *Mar Drugs*. 2021;19(6):345.

96. Andrade F, Antunes F, Nascimento AV, Baptista Da Silva S, Das Neves J, Ferreira D, et al. Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Curr Drug Discov Technol.* 2011;8(3):157–172.
97. Jain SK, Khare P, Gulbake A, Shilpi S. Chitosan: A potencial bio-polymer for drug delivery. In: *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usages.* New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011. p. 413–448.
98. Pillai CKS, Paul W, Sharma CP. Chitosan: Manufacture, properties, and uses. In: *Chitosan: Manufacture, properties and usage.* New York : Nova Science Publishers, Inc. ; 2011. p. 133–215.
99. Grenha A, Al-Qadi S, Seijo B, Remuñán-López C. The potential of chitosan for pulmonary drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2010;20(1):33–43.
100. Ozcan I, Senyigit T, Gokce EH, Ozer O. Current status of chitosan on dermal/transdermal drug delivery systems. In: *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage.* New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011. p. 449–484.
101. Rodrigues S, Dionísio M, López CR, Grenha A. Biocompatibility of chitosan carriers with application in drug delivery. *J Funct Biomater.* 2012;3(3):615–641.
102. Chandrasekaran M, Kim KD, Chun SC. Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: a review. *Processes.* 2020;8(9):1173.
103. Tiwary AK, Sapra B, Kaur G, Rana V. Chitosan: modifications and applications in dosage form design. In: *Chitosan: Manufacture, Properties, and Usage.* New York: Nova Science Publishers, Inc.; 2011. p. 71–131.
104. Andrade F, Goycoolea F, Chiappetta DA, Neves J, Sosnik A, Sarmiento B. Chitosan-grafted copolymers and chitosan-ligand conjugates as matrices for pulmonary drug delivery. *Int J Carbohydr Chem.* 2011;2011:1–14.
105. Abdallah MM, Fernández N, Matias AA, Bronze M do R. Hyaluronic acid and Chondroitin sulfate from marine and terrestrial sources: Extraction and purification methods. *Carbohydr Polym.* 2020;243:116441.
106. Rao NV, Rho JG, Um W, Ek PK, Nguyen VQ, Oh BH, et al. Hyaluronic acid nanoparticles as nanomedicine for treatment of inflammatory diseases. *Pharmaceutics.* 2020;12(10):931.
107. Abdel-Rahman RM, Abdel-Mohsen AM. Marine biomaterials: Hyaluronan. *Mar Drugs.* 2023;21(8):426.
108. Vázquez JA, Rodríguez-Amado I, Montemayor MI, Fraguas J, Del González MP, Murado MA. Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: characteristics, applications and eco-friendly processes: a review. *Mar Drugs.* 2013;11(3):747–774.
109. Yang J, Shen M, Wen H, Luo Y, Huang R, Rong L, et al. Recent advance in delivery system and tissue engineering applications of chondroitin sulfate. *Carbohydr Polym.* 2020;230:115650.
110. Debele TA, Mekuria SL, Tsai HC. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system: Application as the carrier of pharmaceutical agents. *Mater Sci Eng C.* 2016;68:964–981.
111. Waiprib Y, Ingrungruengluet P, Worawattanamateekul W. Nanoparticles based on chondroitin sulfate from tuna heads and chitoooligosaccharides for enhanced water solubility and sustained release of curcumin. *Polymers.* 2023;15(4):834.
112. Khan AR, Yang X, Du X, Yang H, Liu Y, Khan AQ, et al. Chondroitin sulfate derived theranostic and therapeutic nanocarriers for tumor-targeted drug delivery. *Carbohydr Polym.* 2020;233:115837.
113. Zhao L, Liu M, Wang J, Zhai G. Chondroitin sulfate-based nanocarriers for drug/gene delivery. *Carbohydr Polym.* 2015;133:391–399.

114. Amhare AF, Lei J, Deng H, Lv Y, Han J, Zhang L. Biomedical application of chondroitin sulfate with nanoparticles in drug delivery systems: systematic review. *J Drug Target*. 2021;29(3):259–268.
115. Percival E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: Their basic structure, biosynthesis and function. *Brit Phycol J*. 1979;14(2):103–117.
116. Ruitter GA, Rudolph B. Carrageenan biotechnology. *Trends Food Sci Technol*. 1997;8(12):389–395.
117. Lahaye M. Developments on gelling algal galactans, their structure and physico-chemistry. *J Appl Phycol*. 2001;13:173–184.
118. Jiao G, Yu G, Zhang J, Ewart HS. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Mar Drugs*. 2011;9(2):196–223.
119. Li L, Ni R, Shao Y, Mao S. Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydr Polym*. 2014;103:1–11.
120. Necas J, Bartosikova L. Carrageenan: a review. *Vet Med*. 2013;58(4):187–205.
121. Thrimawithana TR, Young S, Dunstan DE, Alany RG. Texture and rheological characterization of kappa and iota carrageenan in the presence of counter ions. *Carbohydr Polym*. 2010;82(1):69–77.
122. Eccles R, Meier C, Jaward M, Weinmüller R, Grassauer A, Prieschl-Grassauer E. Efficacy and safety of an antiviral Iota-Carrageenan nasal spray: a randomized, double-blind, placebo-controlled exploratory study in volunteers with early symptoms of the common cold. *Respir Res*. 2010;11(1):1–10.
123. Wang W, Zhang P, Hao C, Zhang XE, Cui ZQ, Guan HS. In vitro inhibitory effect of carrageenan oligosaccharide on influenza A H1N1 virus. *Antiviral Res*. 2011;92(2):237–246.
124. S.F-Tischer PC, Talarico LB, Nosedá MD, Guimarães SMPB, Damonte EB, Duarte MER. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydr Polym*. 2006;63(4):459–465.
125. Panlasigui LN, Baello OQ, Dimatangal JM, Dumelod BD. Blood cholesterol and lipid-lowering effects of carrageenan on human volunteers. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2003;12(2):209–214.
126. Prajapati VD, Maheriya PM, Jani GK, Solanki HK. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydr Polym*. 2014;105:97–112.
127. Wijesinghe WAJP, Jeon YJ. Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review. *Carbohydr Polym*. 2012;88(1):13–20.
128. Qiu X, Amarasekara AS, Doctor VM. Effect of oversulfation on the chemical and biological properties of fucoidan. *Carbohydr Polym*. 2006;63(2):224–228.
129. Holtkamp AD, Kelly S, Ulber R, Lang S. Fucoidans and fucoidanases—focus on techniques for molecular structure elucidation and modification of marine polysaccharides. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009;82:1–11.
130. Chizhov AO, Dell A, Morris HR, Haslam SMH, McDowell RA, Shashkov AS, et al. A study of fucoidan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydr Res*. 1999;320(1–2):108–119.
131. Kusaykin MI, Chizhov AO, Grachev AA, Alekseeva SA, Bakunina IY, Nedashkovskaya OI, et al. A comparative study of specificity of fucoidanases from marine microorganisms and invertebrates. *J Appl Phycol*. 2006;18:369–373.
132. Hahn T, Lang S, Ulber R, Muffler K. Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochem*. 2012;47(12):1691–1698.

133. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar Drugs*. 2011;9:2106–2130.
134. Duarte MER, Cardoso MA, Nosedá MD, Cerezo AS. Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydr Res*. 2001;333(4):281–293.
135. Ponce NMA, Pujol CA, Damonte EB, Flores ML, Stortz CA. Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydr Res*. 2003;338(2):153–165.
136. Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C.Ag. *Carbohydr Res*. 2002;337(8):719–730.
137. Li B, Wei XJ, Sun JL, Xu SY. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr Res*. 2006;341(9):1135–1146.
138. Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI. A highly regular fraction of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus distichus* L. *Carbohydr Res*. 2004;339(3):511–517.
139. Chevolut L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Collic-Jouault S. A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydr Res*. 2001;330(4):529–535.
140. Zvyagintseva TN, Shevchenko NM, Chizhov AO, Krupnova TN, Sundukova E V., Isakov V V. Water-soluble polysaccharides of some far-eastern brown seaweeds. Distribution, structure, and their dependence on the developmental conditions. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2003;294(1):1–13.
141. Nishino T, Aizu Y, Nagumo T. The relationship between the molecular weight and the anticoagulant activity of two types of fucan sulfates from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Agric Biol Chem*. 1991;55(3):791–796.
142. Fitton JH, Stringer DN, Karpinić SS. Therapies from fucoidan: an update. *Mar Drugs*. 2015;13(9):5920–5946.
143. Rupérez P, Ahrazem O, Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from the edible marine brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *J Agric Food Chem*. 2002;50(4):840–845.
144. Kwak JY. Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Mar Drugs*. 2014;12(2):851–870.
145. Lee JB, Hayashi K, Hashimoto M, Nakano T, Hayashi T. Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chem Pharm Bull*. 2004;52(9):1091–1094.
146. Park HY, Han MH, Park C, Jin CY, Kim GY, Choi IW, et al. Anti-inflammatory effects of fucoidan through inhibition of NF- κ B, MAPK and Akt activation in lipopolysaccharide-induced BV2 microglia cells. *Food Chem Toxicol*. 2011;49(8):1745–1752.
147. Raghavendran HRB, Srinivasan P, Rekha S. Immunomodulatory activity of fucoidan against aspirin-induced gastric mucosal damage in rats. *Int Immunopharmacol*. 2011;11(2):157–163.
148. Teng H, Yang Y, Wei H, Liu Z, Liu Z, Ma Y, et al. Fucoidan suppresses hypoxia-induced lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in mouse hepatocarcinoma. *Mar Drugs*. 2015;13(6):3514–3530.
149. He L, Shang Z, Liu H, Yuan Z xiang. Alginate-based platforms for cancer-targeted drug delivery. *Biomed Res Int*. 2020;2020:1–17.

150. Severino P, da Silva CF, Andrade LN, Oliveira D de L, Campos J, Souto EB. Alginate nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr Pharm Des.* 2019;25(11):1312–1334.
151. Hariyadi DM, Islam N. Current status of alginate in drug delivery. *Adv Pharmacol Pharm Sci.* 2020;2020:8886095.
152. Sosnik A. Alginate particles as platform for drug delivery by the oral route: state-of-the-art. *ISRN Pharm.* 2014;2014:926157.
153. Choukaife H, Doolaanea AA, Alfatama M. Alginate nanoformulation: influence of process and selected variables. *Pharmaceuticals.* 2020;13(11):335.
154. Niculescu AG, Grumezescu AM. Applications of chitosan-alginate-based nanoparticles— an up-to-date review. *Nanomaterials.* 2022;12(2):186.
155. Mollah MZI, Zahid HM, Mahal Z, Faruque MRI, Khandaker MU. The usages and potential uses of alginate for healthcare applications. *Front Mol Biosci.* 2021;8:719972.
156. Lim YS, Ok YJ, Hwang SY, Kwak JY, Yoon S. Marine collagen as a promising biomaterial for biomedical applications. *Mar Drugs.* 2019;17(8):467.
157. Xu N, Peng XL, Li HR, Liu JX, Cheng JSY, Qi XY, et al. Marine-derived collagen as biomaterials for human health. *Front Nutr.* 2021;8:702108.
158. Feng C, Wang Z, Jiang C, Kong M, Zhou X, Li Y, et al. Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: In vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2013;457(1):158–167.
159. Yin L, Ding J, He C, Cui L, Tang C, Yin C. Drug permeability and mucoadhesion properties of thiolated trimethyl chitosan nanoparticles in oral insulin delivery. *Biomaterials.* 2009;30(29):5691–5700.
160. Slütter B, Plapied L, Fievez V, Alonso Sande M, des Rieux A, Schneider YJ, et al. Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. *J Control Release.* 2009;138(2):113–121.
161. Wang X, Zheng C, Wu Z, Teng D, Zhang X, Wang Z, et al. Chitosan-NAC nanoparticles as a vehicle for nasal absorption enhancement of insulin. *J Biomed Mater Res.* 2009;88(1):150–161.
162. Nagamoto T, Hattori Y, Takayama K, Maitani Y. Novel chitosan particles and chitosan-coated emulsions inducing immune response via intranasal vaccine delivery. *Pharm Res.* 2004;21(4):671–674.
163. Wang X, Chi N, Tang X. Preparation of estradiol chitosan nanoparticles for improving nasal absorption and brain targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(3):735–740.
164. Wang J, Lu Z, Wientjes MG, Au JLS. Delivery of siRNA therapeutics: barriers and carriers. *AAPS J.* 2010;12(4):492–503.
165. Thomas M, Klivanov AM. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;62(1):27–34.
166. Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials.* 2010;31(26):6867–6875.
167. Li S, Tian X, Fan J, Tong H, Ao Q, Wang X. Chitosans for tissue repair and organ three-dimensional (3D) bioprinting. *Micromachines.* 2019;10(11):765.
168. Sun X, Zhang N. Cationic polymer optimization for efficient gene delivery. *Mini Rev Med Chem.* 2010;10(2):108–125.
169. Mao S, Sun W, Kissel T. Chitosan-based formulations for delivery of DNA and siRNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(1):12–27.
170. Petrovsky N, Cooper PD. Carbohydrate-based immune adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(4):523–537.

171. Zaharoff DA, Rogers CJ, Hance KW, Schlom J, Greiner JW. Chitosan solution enhances both humoral and cell-mediated immune responses to subcutaneous vaccination. *Vaccine*. 2007;25(11):2085–2094.
172. Zaharoff DA, Hance KW, Rogers CJ, Schlom J, Greiner JW. Intratumoral immunotherapy of established solid tumors with chitosan/IL-12. *J Immunother*. 2010;33(7):697–705.
173. Li F, Shi Y, Liang J, Zhao L. Curcumin-loaded chitosan nanoparticles promote diabetic wound healing via attenuating inflammation in a diabetic rat model. *J Biomater Appl*. 2019;34(4):476–486.
174. de la Fuente M, Seijo B, Alonso MJ. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(5):2016–2024.
175. Han L, Zhao Y, Yin L, Li R, Liang Y, Huang H, et al. Insulin-loaded pH-sensitive hyaluronic acid nanoparticles enhance transcellular delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2012;13(3):836–845.
176. Dul M, Paluch KJ, Kelly H, Healy AM, Sasse A, Tajber L. Self-assembled carrageenan/protamine polyelectrolyte nanoplexes—Investigation of critical parameters governing their formation and characteristics. *Carbohydr Polym*. 2015;123:339–349.
177. Dionísio M, Cordeiro C, Remuñán-López C, Seijo B, Costa AMR, Grenha A. Pullulan-based nanoparticles as carriers for transmucosal protein delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2013;50(1):102–113.
178. Cheow WS, Kiew TY, Hadinoto K. Amorphous nanodrugs prepared by complexation with polysaccharides: Carrageenan versus dextran sulfate. *Carbohydr Polym*. 2015;117:549–558.
179. Rodrigues S, Costa AMR, Grenha A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydr Polym*. 2012;89(1):282–289.
180. Rodrigues S, Cordeiro C, Seijo B, Remuñán-López C, Grenha A. Hybrid nanosystems based on natural polymers as protein carriers for respiratory delivery: Stability and toxicological evaluation. *Carbohydr Polym*. 2015;123:369–380.
181. Bulmer C, Margaritis A, Xenocostas A. Encapsulation and controlled release of recombinant human erythropoietin from chitosan-carrageenan nanoparticles. *Curr Drug Deliv*. 2012;9(5):527–537.
182. Rosas-Durazo A, Lizardi J, Higuera-Ciapara I, Argüelles-Monal W, Goycoolea FM. Development and characterization of nanocapsules comprising dodecyltrimethylammonium chloride and κ -carrageenan. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2011;86(1):242–246.
183. Huang YC, Lam UI. Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. *J Chin Chem Soc*. 2011;58(6):779–785.
184. Yu SH, Wu SJ, Wu JY, Wen DY, Mi FL. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. *Carbohydr Polym*. 2015;126:97–107.
185. Wu SJ, Don TM, Lin CW, Mi FL. Delivery of berberine using chitosan/fucoidan-aurine conjugate nanoparticles for treatment of defective intestinal epithelial tight junction barrier. *Mar Drugs*. 2014;12(11):5677–5697.
186. Huang YC, Li RY. Preparation and characterization of antioxidant nanoparticles composed of chitosan and fucoidan for antibiotics delivery. *Mar Drugs*. 2014;12(8):4379–4398.
187. Huang YC, Yang YT. Effect of basic fibroblast growth factor released from chitosan–fucoidan nanoparticles on neurite extension. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;10(5):418–427.

188. Huang YC, Liu TJ. Mobilization of mesenchymal stem cells by stromal cell-derived factor-1 released from chitosan/tripolyphosphate/fucoidan nanoparticles. *Acta Biomater.* 2012;8(3):1048–1056.
189. Tsai LC, Chen CH, Lin CW, Ho YC, Mi FL. Development of multifunctional nanoparticles self-assembled from trimethyl chitosan and fucoidan for enhanced oral delivery of insulin. *Int J Biol Macromol.* 2019;126:141–150.
190. Lee KW, Jeong D, Na K. Doxorubicin loading fucoidan acetate nanoparticles for immune and chemotherapy in cancer treatment. *Carbohydr Polym.* 2013;94(2):850–856.
191. Suzuki M, Bachelet-Violette L, Rouzet F, Beilvert A, Autret G, Maire M, et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with fucoidan for molecular MRI of intraluminal thrombus. *Nanomedicine.* 2015;10(1):73–87.
192. Lira MCB, Santos-Magalhães NS, Nicolas V, Marsaud V, Silva MPC, Ponchel G, et al. Cytotoxicity and cellular uptake of newly synthesized fucoidan-coated nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm.* 2011;79(1):162–170.
193. Nagarwal RC, Kumar R, Pandit JK. Chitosan coated sodium alginate–chitosan nanoparticles loaded with 5-FU for ocular delivery: In vitro characterization and in vivo study in rabbit eye. *Eur J Pharm Sci.* 2012;47(4):678–685.
194. Katuwavila NP, Perera ADLC, Samarakoon SR, Soysa P, Karunaratne V, Amaratunga GAJ, et al. Chitosan-alginate nanoparticle system efficiently delivers doxorubicin to MCF-7 cells. *J Nanomater.* 2016;2016:1–12.
195. Nicklas M, Schatton W, Heinemann S, Hanke T, Kreuter J. Preparation and characterization of marine sponge collagen nanoparticles and employment for the transdermal delivery of 17beta-estradiol-hemihydrate. *Drug Dev Ind Pharm.* 2009;35(9):1035–1042.