



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia

**Formulação de nanopartículas poliméricas a partir de
extratos das algas marinhas comestíveis
*Laminaria ochroleuca e Himanthalia elongata***

Carolina Alexandra Ramalho Afonso

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de Prof. Doutora Ana Margarida Moutinho Grenha e
coorientação de Doutora Noelia Flórez Fernández

2022



UNIVERSIDADE DO ALGARVE

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Química e Farmácia

**Formulação de nanopartículas poliméricas a partir de
extratos das algas marinhas comestíveis
*Laminaria ochroleuca e Himanthalia elongata***

Carolina Alexandra Ramalho Afonso

Dissertação para obtenção de grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob orientação de Prof. Doutora Ana Margarida Moutinho Grenha e
coorientação de Doutora Noelia Flórez Fernández

2022

**Formulação de nanopartículas poliméricas a partir de
extratos das algas marinhas comestíveis
*Laminaria ochroleuca e Himanthalia elongata***

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.

(Carolina Alexandra Ramalho Afonso)

Copyright® 2022 Carolina Alexandra Ramalho Afonso

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

Perguntei ao vento onde foi encontrar mago sopra encanto (...)

(...) Foi nas ondas do mar.

(...) a sorte é de quem a terra amou e no peito guardou.

Vitorino Salomé

Agradecimentos

Não poderia estar mais feliz por poder escrever este texto, significa o culminar de mais uma etapa ao longo destes 5 anos. Esta foi certamente a etapa mais complicada para mim e nunca teria conseguido sem aqueles que contribuíram e lutaram para que isto fosse possível. Deixo aqui um agradecimento a todos os que fizeram parte deste processo.

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Margarida Grenha, que para além de me ajudar em toda esta aventura, transmitiu o gosto pela área da tecnologia farmacêutica e abriu as portas ao seu laboratório dando-me a oportunidade de contactar com uma realidade que desconhecia e sem dúvida deixou em mim um gosto diferente. Foi uma experiência incrível e agradeço-lhe pelo conhecimento e pelo voto de confiança.

À minha coorientadora, Professora Doutora Noelia Flórez Fernández, que foi um grande pilar para mim neste processo. Obrigada por nunca me ter deixado desistir, por transmitir tanta sabedoria, por me responder a todas as mensagens a horas indecentes e por termos criado uma amizade tão boa para além de tudo.

Aos meus pais, Carmo e Miguel, que incondicionalmente vivem as minhas vitórias e as minhas derrotas. É a eles que lhes devo este mundo e outro. Obrigada por me permitirem ter estudado o curso que sempre sonhei, por me apoiarem em todas as minhas decisões. Obrigada! Sou uma filha orgulhosa dos pais que tem, por fazerem grandes sacrifícios para proporcionar o melhor para os seus filhos. São a minha força e serão sempre a minha inspiração.

Aos meus irmãos, Rodrigo e Raquel, que estão sempre presentes. É com orgulho que digo e falo dos meus irmãos e deixa-me de lagrima ao canto do olho porque os amo muito. Obrigada por me apoiarem incondicionalmente, estarei sempre aqui como vocês estão para mim. Um obrigado aos meus cunhados, Maria e Sérgio, por me aturarem.

Às minhas amigas desde quase sempre, Joana e Carolina, são amizades que eu tenho para a vida toda. Obrigada pelo vosso apoio, preocupação e risadas!

À minha madrinha de curso, Patrícia, que me acolheu como todo o carinho, que me transmitiu e me acompanhou em tudo nesta universidade. Obrigada por seres a minha companheira. Obrigada, por me ajudares a acolher a minha afilhada. Margarida, obrigada por seres a minha pupila e me permitires partilhar os momentos lindos que partilhamos juntas. Serás para sempre a minha menina. Obrigada às duas por tornarem o meu percurso na universidade muito mais bonito e completo.

Grande obrigada aos melhores amigos que poderia ter tido no algarve. Um especialmente agradecimento à minha marida, Filipa Neves, por fazeres parte de tudo e seres uma das minhas melhores amigas neste processo. Obrigada pelas risadas, pelos momentos de desespero, por seres minha cúmplice e por termos a relação de irmãs desde o início. Esta jornada deve-se muito a ti. Obrigada também os meus amigos Telma, Anna, Ricardo, Marcelo e mano João, por me acompanharem em tudo e deixarem sair do algarve com o coração cheio de amizades para uma vida.

Ao meu namorado, Pedro, que fez parte de quase tudo. Obrigada pela paciência, amor e carinho. És uma das pessoas mais importantes que me acompanhou neste processo e agradeço-te imenso por isso.

À Feminis Ferventis, Tuna Feminina da Universidade do Algarve, que me ajudou a crescer. Obrigada pelos momentos espetaculares que me proporcionaram. E foi também por vocês que hoje digo e canto que,

“No Algarve um dia fui feliz”...

Resumo

O mundo está em constante evolução e desde muito cedo que a tecnologia e as áreas da saúde se interligam. A nanotecnologia aplicada aos medicamentos nasceu dessa ligação e com ela os nanomedicamentos que se tornaram uma alternativa eficaz para superar algumas das limitações observadas nas formas farmacêuticas convencionais. As matérias-primas de origem marinha têm sido estudadas e exploradas com o propósito de serem aplicadas na área farmacêutica por serem fontes ricas em compostos bioativos. Com o objetivo de potenciar a utilização desses recursos, esta dissertação dedicou-se ao estudo e desenvolvimento de nanopartículas poliméricas por complexação polieletrólítica utilizando materiais de origem marinha, mais concretamente extratos de algas castanhas ricas em fucoídano (FUCe) e quitosano (CS), polissacarídeo que forma parte do exoesqueleto dos crustáceos. Os extratos recolhidos de FUCe provêm de duas algas marinhas castanhas: *Laminaria ochroleuca* e *Himanthalia elongata* (também conhecidas comercialmente como Kombu e Esparguete do mar, respetivamente), obtidos por um processo de extração com água subcrítica realizado a diferentes temperaturas, especificamente 120 °C, 160 °C e 220 °C.

Este trabalho teve como finalidade avaliar o impacto que as diferentes temperaturas utilizadas na extração dos constituintes das algas têm na sua capacidade de formação de nanopartículas poliméricas e suas características físico-químicas, nomeadamente através de avaliação do tamanho e distribuição de tamanho, da carga superficial (potencial zeta) e rendimento de produção. De uma maneira geral, os resultados permitiram tirar algumas conclusões, incluindo o facto de que a temperatura de extração e a concentração de FUCe utilizada nas formulações têm impacto no tamanho das nanopartículas. Em relação ao potencial zeta, apresentou sempre valores positivos, mesmo quando a quantidade de extrato era maior, o que indicia que a densidade de carga do CS é muito maior do que a de FUCe.

Palavras-chave: Complexação polieletrólítica; Extratos de algas; Fucoídano; Nanopartículas; Quitosano;

Abstract

The world is in constant evolution, since early that technology and health areas have been interconnected. Nanotechnology applied to medicines was born from this connection and with it, the nanomedicines have become an effective alternative to overcome some of the limitations observed in conventional pharmaceutical forms. The raw materials of marine origin have been studied and explored with the purpose of being applied in the pharmaceutical area thanks to being a rich source of bioactive compounds. In order to potentiate the use of these resources, this dissertation is focused on the study and development of polymeric nanoparticles by polyelectrolytic complexation using materials of marine origin, brown seaweed extracts rich in fucoidan (FUCe) and chitosan (CS), a polysaccharide found in crustaceans exoskeleton. The FUCe extracts were obtained from two seaweed: *Laminaria ochroleuca* and *Himanthalia elongata* (also known commercially as Kombu and Sea spaghetti, respectively), obtained by a ecofriendly extraction technology known as subcritical water extraction using only water as solvent. This process was carried out at several temperatures, specifically 120 °C, 160 °C and 220 °C.

The aim of this work was to evaluate the impact that the different extraction temperatures used to obtain extracts from two brown seaweeds has in their ability to formulate polymeric nanoparticles and their physicochemical properties, namely size, zeta potential and production yield. Overall, the results permitted some conclusions, including the fact that the extraction temperature and the FUCe concentration used in the formulation have impact in the size of the nanoparticles. Moreover, positive zeta potential was obtained in all conditions, even when fucoidan extract prevailed, which indicates higher CS charge density as compared with FUCe.

Keywords: Chitosan; Fucoidan; Nanoparticles; Polyelectrolytic complexation; Seaweed extracts;

Índice

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1. Introdução	1
1.1 Nanotecnologia e a sua importância.....	4
1.2 Sistemas nanoparticulados	7
1.3 Compostos bioativos de origem marinha no processo de elaboração de nanopartículas.....	9
1.3.1 Fucoidano.....	9
1.3.2 Quitosano.....	13
1.4 Complexação Polieletrólítica	16
2. Objetivo.....	19
3. Materiais e Métodos.....	20
3.1 Matérias-primas.....	20
3.2 Reagentes.....	20
3.3 Equipamentos	20
3.4 Produção das nanopartículas	21
3.5 Caracterização das nanopartículas.....	23
3.5.1 Propriedades físico-químicas.....	23
3.5.2 Rendimento de produção das nanopartículas.....	23
3.5.3 Análise estatística.....	24
4. Resultados e Discussão.....	25
4.1 Caracterização das nanopartículas.....	26
4.1.1 Nanopartículas elaboradas com extratos de <i>Laminaria ochroleuca</i>	29

4.1.2 Nanopartículas elaboradas com extratos de <i>Himantalia elongata</i>	36
5. Conclusão e Perspetivas Futuras	42
6. Referências.....	43
7. Anexos.....	52
7.1 Desenho experimental das nanopartículas CS/FUCe.....	52
7.2 Resultados obtidos.....	53

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Representação gráfica das principais causas de morte nível mundial em 2000 (○ - círculo vazio) e 2019 (● - círculo preenchido). Adaptado de (1).....	1
Figura 1.2 – Exemplos de estruturas à escala nanométrica. Adaptado de (11).....	4
Figura 1.3 – Tipo de terminologias usadas para os sistemas nanoparticulados. Adaptado de (54).....	7
Figura 1.4 – Imagem representativa das algas (a) <i>Laminaria ochroleuca</i> e (b) <i>Himanthalia elongata</i> . Adaptado de (59).....	9
Figura 1.5 – Modelos da estrutura química do fucoidano das várias algas marinhas castanhas pertencentes a ordens taxonómicas Fucales e Laminariales. (a) Modelo estrutural de algumas algas da ordem Fucales (C-2 é sempre substituído por um grupo sulfato). (b) Modelo estrutural de algumas algas da ordem Laminariales. O R representa as posições de ligação potencial de resíduos de carboidratos (ácido glucurónico, manose, galactose, xilose, α -L-fucose) e substituintes não carboidratos (grupos sulfato e acetato) (66).	12
Figura 1.6 – Processo de desacetilação de quitina. Adaptado de (72).....	13
Figura 1.7 – Representação da estrutura química do CS. A estequiometria de n:m é aproximadamente de 8:2. Adaptado de (79).....	14
Figura 1.8 – Efeito da carga dos polieletrólitos na carga superficial do complexo de polieletrólitos (PEC) formados. Adaptado de (83).....	17
Figura 3.1 – Representação esquemática do processo de formulação das nanopartículas CS/FUCe por complexação polieletrólítica.....	22
Figura 4.1 – A e B: Representação esquemática do tamanho de partículas de uma polidispersão (A) e de uma monodispersão (B). C e D: Representação esquemática da distribuição de tamanho de partículas de uma amostra com partículas polidispersas ($Pdl > 0,7$) (C) e de uma amostra com partículas monodispersas ($Pdl < 0,3$) (D). Adaptado de (87), estudo de nanossistemas lipídicos.	27

Figura 4.2 - Tamanho médio das nanopartículas quitosano/fucoidano (CS/FUCe = 4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga <i>Laminaria ochroleuca</i> obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão (n ≥ 3). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.....	30
Figura 4.3 - Potencial zeta médio das nanopartículas CS/FUCe (4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga <i>Laminaria ochroleuca</i> obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão (n ≥ 3). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.....	33
Figura 4.4 - Espectro FTIR de extratos bioativos obtidos por auto hidrólise de <i>Laminaria ochroleuca</i> a diferentes temperaturas de extração. Adaptado de (62).....	35
Figura 4.5 - Eppendorfs relativos a amostras de nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos obtidos de <i>Laminaria ochroleuca</i> e <i>Himanthalia elongata</i> após liofilização. 5C – CS/FUCe = 1/4, 160 °C <i>Laminaria ochroleuca</i> ; 7C – CS/FUCe = 1/1, 160 °C <i>Himanthalia elongata</i> ; 8C – CS/FUCe = 1/1, 120 °C <i>Himanthalia elongata</i> . Amostra 6C não relevante para o trabalho em questão.....	36
Figura 4.6 - Imagens representativas da formação de precipitado nas nanopartículas (a) CS/FUCe = 1/4 produzidas com extrato obtido a 120 °C e (b) CS/FUCe =1/4 produzidas com extrato obtido a 160 °C. Os tubos relativos a cada caso estão indicados com uma seta.....	37
Figura 4.7 - Tamanho médio das nanopartículas CS/FUCe (4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga <i>Himanthalia elongata</i> obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão (n ≥ 3). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.....	37
Figura 4.8 - Potencial zeta médio das nanopartículas CS/FUCe (4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga <i>Himanthalia elongata</i> obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão (n ≥ 3). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.....	39
Figura 4.9 - Espectro FTIR de extratos bioativos obtidos por auto hidrólise de extratos líquidos de <i>Himanthalia elongata</i> a diferentes temperaturas de extração. Adaptado de (61).....	40

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Vantagens e desvantagens do uso de nanopartículas na área farmacêutica. Adaptado de (56).....	8
Tabela 3.1 – Registo da marca e modelo dos equipamentos utilizados.....	20
Tabela 3.2 – Algas de origem e temperaturas de extração utilizadas para produção de nanopartículas com diferentes rácios de massa entre os extratos de fucoidano (FUCe) e quitosano (CS).....	21
Tabela 4.1 – Índice de polidispersão (Pdl) das nanopartículas CS/FUCe formuladas com <i>Laminaria ochroleuca</i> (média \pm desvio padrão; $n \geq 3$). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall estão assinaladas com *.....	32
Tabela 4.2 – Índice de polidispersão (Pdl) das nanopartículas CS/FUCe formuladas com <i>Himanthalia elongata</i> (média \pm desvio padrão; $n \geq 3$). Estes dados encontram-se em anexo..	38
Tabela 4.3 –Rendimento de produção das nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos da alga <i>Himanthalia elongata</i> obtidos a diferentes temperaturas. Os resultados representam a média e o desvio padrão ($n=3$).....	41
Tabela 7.1 – Volumes e concentrações de todos os componentes utilizados na preparação das nanopartículas CS/FUCe.....	52
Tabela 7.2 – Valores de tamanho (nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (mV) obtidos nas nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos obtidos de <i>Laminaria ochroleuca</i>	53
Tabela 7.3 – Resultados obtidos do rendimento de produção em nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos da alga <i>Laminaria ochroleuca</i> a diferentes temperaturas. Os resultados representam a média e o desvio padrão.....	53
Tabela 7.4 – Valores de tamanho (nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (mV) obtidos nas nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos obtidos de <i>Himanthalia elongata</i>	54

Tabela 7.5 – Resultados obtidos do rendimento de produção em nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos da alga *Himanthalia elongata* a diferentes temperaturas. Os resultados representam a média e o desvio padrão. 54

Lista de Abreviaturas

CS – Quitosano

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

FUCe – Extrato de fucoídano

NK – Natural *killer*

Pdl – Índice de polidispersão

PEC – Complexo de polieletrólitos

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular, do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor*

1. Introdução

O mundo está em constante evolução e nos últimos anos verificou-se um grande progresso em áreas relacionadas com a saúde e bem-estar, como a medicina, farmácia e biomedicina, entre outras. Para melhor analisar os resultados em saúde, utilizam-se como referência determinados indicadores, os quais permitem fazer uma avaliação comparativa, como por exemplo, a taxa de mortalidade mundial e as causas associadas. Num estudo da OMS de 2019 (1), verificou-se que as principais causas de morte, de forma generalizada, estão associadas a três grandes tópicos: doenças cardiovasculares (acidente vascular cerebral, doença isquémica cardíaca), doenças respiratórias (doença pulmonar obstrutiva crónica, infeções respiratórias das vias inferiores) e condições neonatais (que incluem trauma e asfixia após o nascimento, sépsis neonatal, complicações associadas ao parto prematuro) (Figura 1.1).



Figura 1.1 – Representação gráfica das principais causas de morte nível mundial em 2000 (○ - círculo vazio) e 2019 (● - círculo preenchido). Adaptado de (1).

A nível global, em 2019, verificou-se que 7 das 10 principais causas de morte foram provocadas por doenças não transmissíveis (1). Atualmente, as doenças transmissíveis deixaram de repercutir uma grande percentagem como principal causa de morte quando se estabelece uma comparação com o ano 2000. Esta premissa reflete a evolução em saúde ao longo dos anos. Isto pode ser justificado com o aumento do conhecimento sobre as doenças e estados de saúde, promovendo um diagnóstico mais precoce das doenças, melhorias no controlo e cuidados preventivos das doenças, melhoria dos cuidados de saúde, eficácia e otimização dos meios terapêuticos e produtos relacionados com a melhoria do estado de saúde (suplementos alimentares, nutracêuticos, alimentos funcionais) (2).

Desde muito cedo que a tecnologia e as áreas da saúde se interligam e grande parte do desenvolvimento da medicina deve-se à evolução tecnológica. O avanço tecnológico permite compreender cada vez mais o funcionamento do organismo, bem como diagnóstico e tratamento da doença, o que promove o prolongamento do ciclo de vida e melhoria da qualidade de vida com a descoberta e implementação de novos tratamentos para patologias anteriormente consideradas terminais ou incuráveis, assim como, maior agilidade e eficiência em procedimentos e perícia no tratamento de patologias agudas. Este nível de desenvolvimento tecnológico, aliado a uma mudança na prática médica, revolucionou os cuidados de saúde de tal maneira, que a atividade médica é considerada inerente à tecnologia (3).

Consequentemente, à medida que as patologias se tornam mais difíceis de tratar, a comunidade farmacêutica tenta desenvolver novas abordagens tecnológicas. Desta forma, houve a necessidade de modificar alguns dos processos de desenvolvimento de fármacos (4,5). Por exemplo, atualmente já é possível a criação de estruturas moleculares potencialmente eficazes antes de as desenvolver verdadeiramente com o recurso a técnicas *in silico*. Os ensaios *in vitro* tornaram-se abordagens experimentais insatisfatórias para explorar novos fármacos e os seus recetores alvo, devido aos problemas de viabilidade, visto que compreendem processos trabalhosos, dispendiosos e demorados. A bioinformática surgiu nas últimas décadas para auxiliar os estudos, ao estimar estatisticamente interações biológicas desconhecidas entre os

compostos e os respectivos alvos biológicos, num processo também conhecido como *virtual screening* (6). Também, a título de exemplo, a técnica de recombinação de DNA veio revolucionar o processo de desenvolvimento de novos fármacos. Esta técnica permite isolar e ampliar parte do DNA humano (gene de interesse) e inseri-lo noutra DNA para que sirva como veículo ou vetor e replicar o gene de interesse em células vivas (7).

Por outro lado, as várias vias de administração de fármacos condicionam de alguma forma a sua biodisponibilidade (8). Os fármacos, para atingirem a biofase e exercerem o seu efeito farmacológico, estão sujeitos a vários fatores que podem interferir com a sua disponibilidade durante a fase biofarmacêutica, como por exemplo, a estabilidade, a desintegração, a libertação e a velocidade de dissolução do fármaco a partir das diferentes formas farmacêuticas (9). O aumento da dose administrada é, com frequência, uma das estratégias convencionalmente utilizada para ultrapassar dificuldades associadas à biodisponibilidade (8). Os avanços das tecnologias associadas à administração de fármacos, mostraram que a utilização de sistemas de veiculação de fármacos poderia trazer benefícios a este nível. Estas tecnologias têm vindo a refinar-se e tornar-se cada vez mais completas e complexas, permitindo atribuir aos fármacos propriedades muito atrativas e diferenciadoras. Os sistemas de veiculação podem assumir características muito variadas, podendo por exemplo ter tamanhos muito diferentes, à escala nano, micro ou macrométrica.

A nanotecnologia associada ao medicamento é atualmente uma área em grande expansão e será abordada com maior detalhe na secção seguinte.

1.1 Nanotecnologia e a sua importância na terapêutica

O ponto de partida da nanotecnologia começou quando Richard Feynman, um físico americano que viria a receber um prêmio Nobel da física, apresentou o conceito de nanotecnologia numa reunião através da palestra “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”. Nesta palestra, Feynman propôs a hipótese “Por que não podemos escrever todos os 24 volumes da Enciclopédia Britânica na cabeça de um alfinete?”. Desta forma, Richard Feynman foi considerado o pai da nanotecnologia moderna (10).

A nanociência é a ciência que estuda as estruturas e moléculas à escala nanométrica (entre 1 e 1000 nm). A nanotecnologia é a tecnologia que promove a formação de nanomateriais com aplicações práticas. A Figura 1.2 apresenta vários exemplos de estruturas à escala nanométrica.

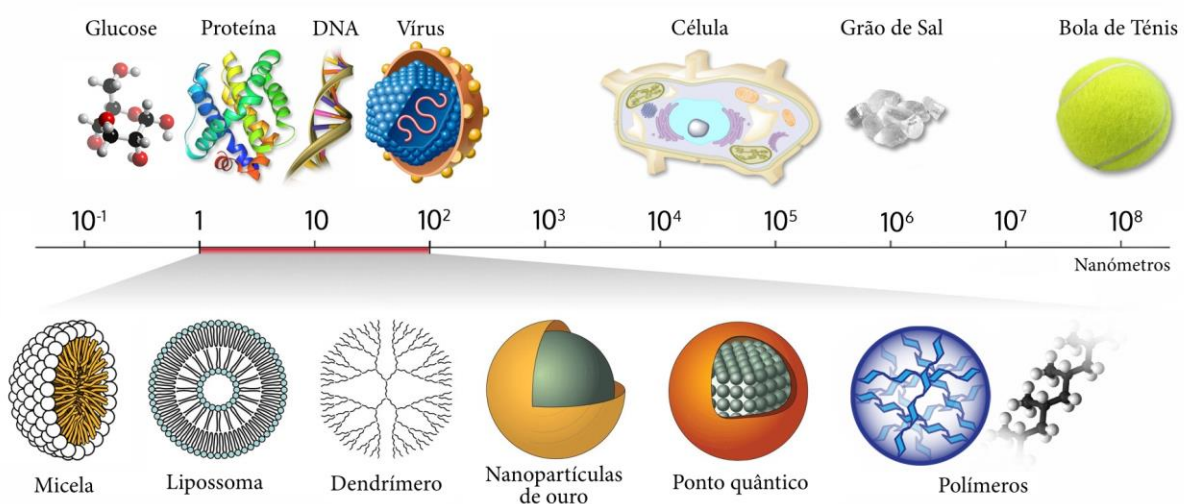


Figura 1.2 – Exemplos de estruturas à escala nanométrica. Adaptado de (11).

Nos últimos 40 anos, a síntese de novos nanomateriais aumentou rapidamente devido à vasta gama de aplicações que estas estruturas possibilitam, que incluem a medicina, engenharia, eletrónica, alimentação, gestão de resíduos, cosmética, entre outras (12). Ao encontro do que foi dito anteriormente, a nanotecnologia oferece cada vez mais garantias no que diz respeito a avanços no diagnóstico, prevenção e tratamento de problemas de saúde atuais (13).

A aplicação de nanotecnologia na área farmacêutica deu origem aos nanomedicamentos e tornou-se numa alternativa eficaz para superar algumas das limitações observadas nas formas farmacêuticas convencionais, promovendo a melhoria da biodisponibilidade dos fármacos, o aumento da estabilidade e/ou uma distribuição mais seletiva para o local de ação (8), bem como potencialmente a redução da dose terapêutica e da toxicidade do fármaco (13). Os fármacos são associados aos nanossistemas durante o processo de formulação, com a intenção de que seja proporcionada uma libertação mais eficaz dos mesmos no organismo (14,15).

A utilização de sistemas de veiculação à escala nanométrica tornou-se atrativa porque estes podem atingir regiões de relevo após administração pelas mais diversas vias, o que pode trazer benefícios no tratamento de algumas doenças face à utilização de formas farmacêuticas tradicionais. Estas vantagens estão amplamente reportadas para uma variedade de vias de administração que incluem a via oral (16–18), parenteral (19–21), nasal (22,23) e pulmonar (24–26), entre outras. Outras vias como a ocular (27,28) e a vaginal (29–31), também têm sido objeto de estudo para a nanotecnologia farmacêutica.

Com a possibilidade de diminuir a incidência dos efeitos secundários associados à utilização dos fármacos livres, uma das aplicações mais frequentemente apontada para os nanomedicamentos é a terapêutica anticancerígena. Para além disso, com o objetivo de melhorar as terapêuticas já existentes na área da oncologia, vários investigadores estudaram que os nanomateriais podem ser potencialmente utilizados no diagnóstico, prevenção e terapêutica personalizada para o cancro (32–35). Uma das terapêuticas estudadas é o paclitaxel, pois a ligação deste fármaco a nanopartículas, como por exemplo, de albumina (Abraxane®) permitiu diminuir a citotoxicidade e melhorar o efeito farmacológico deste fármaco nas células tumorais por apresentar maior permeabilidade e tempo de retenção nas mesmas (36,37). Por outro lado, também a título de exemplo, foi feito um estudo *in vivo* em que se verificou uma diminuição dos efeitos adversos obtidos com a administração de nanopartículas de doxorubicina quando comparada com o fármaco na forma livre (38).

Estratégias de nanotecnologia têm também sido propostas para mitigar a resistência bacteriana e fúngica aos regimes terapêuticos existentes (39–41), tópico que é alvo de grande preocupação por parte dos profissionais de saúde, até mesmo devido à falta de terapêuticas alternativas (12). Também a tuberculose, por exemplo, que é uma doença com uma taxa de mortalidade notável a nível mundial, tem vindo a ser alvo de muita investigação. Existe literatura disponível acerca desta doença, cujo tratamento envolve mais do que um fármaco ao longo de um elevado período de tempo, com efeitos secundários severos em alguns casos, o que desincentiva a adesão à terapêutica por parte dos doentes (12). Desta forma, foi proposto a utilização de nanossistemas para veiculação de fármacos tuberculostáticos (42–44) por várias vias de administração incluindo oral (45–48), pulmonar (47,49,50), intravenosa (51) e subcutânea (52,53).

Considerando o que foi descrito anteriormente, fica patente que o avanço da nanotecnologia promoveu a elaboração de nanomateriais, os quais, devido às suas características e propriedades, podem ser de interesse para aplicação na área farmacêutica como veículos de fármacos.

1.2 Sistemas nanoparticulados

Os nanotransportadores são sistemas crescentemente explorados como veículos de fármacos, que protegem os fármacos associados da degradação e, potencialmente, permitem a sua libertação prolongada e controlada. Como se mostra na Figura 1.3, estes assumem diversas formas e composições, podendo ser constituídos por materiais diversos, que incluem polímeros, lípidos e compostos organometálicos, entre outros. Neste trabalho será colocado um foco nos sistemas poliméricos, pelo que se descrevem de seguida as suas características com maior detalhe.

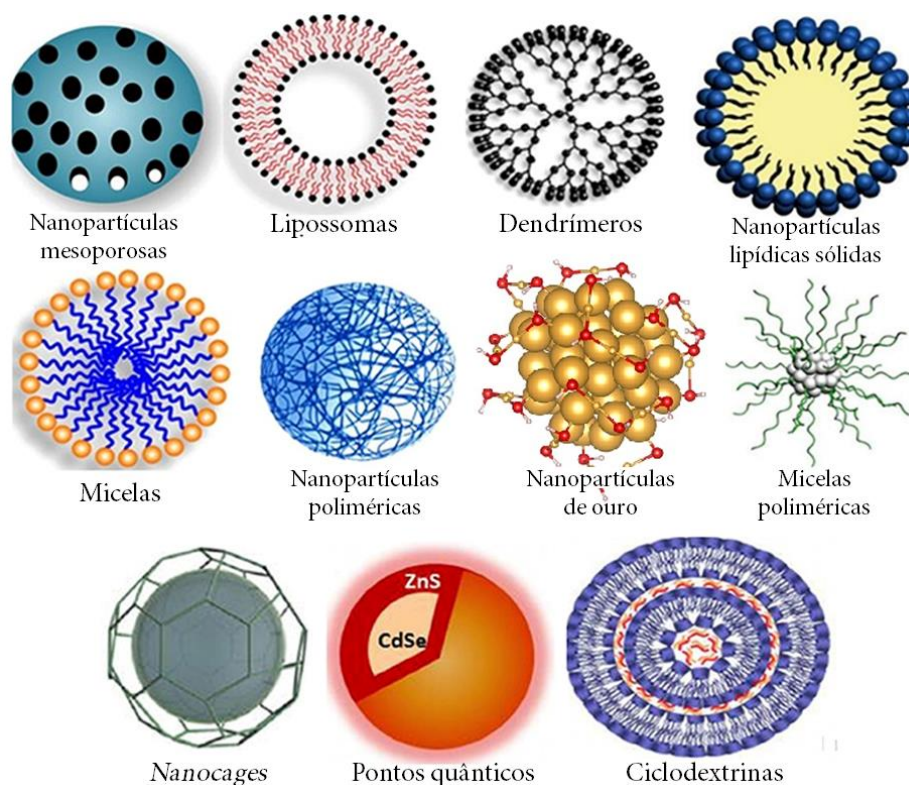


Figura 1.3 – Tipo de terminologias usadas para os sistemas nanoparticulados. Adaptado de (54).

1.2.1 Nanopartículas poliméricas

Os nanossistemas poliméricos são geralmente divididos em nanoesferas e nanocápsulas. São constituídos por polímeros e/ou copolímeros, que podem ser de origem natural ou sintética. Para serem passíveis de uma utilização com fins farmacêuticos, os referidos polímeros devem cumprir certos requisitos, que incluem biodegradabilidade, biocompatibilidade, facilidade de excreção, ausência de toxicidade, flexibilidade e boas propriedades mecânicas.

Desta forma, o objetivo da utilização das nanopartículas é aumentarem a solubilidade do fármaco, fornecerem um bom controlo farmacocinético e serem estáveis, não tóxicas, não imunogénicas e biodegradáveis, uma vez que maioritariamente os produtos finais são álcoois não nocivos e outros produtos de baixo peso molecular (55). A Tabela 1.1 resume algumas vantagens e desvantagens do uso de nanopartículas para aplicações na área farmacêutica.

Tabela 1.1 – Vantagens e desvantagens do uso de nanopartículas na área farmacêutica. Adaptado de (56).

Vantagens	Desvantagens
Elevada relação superfície/volume	Forma física indefinida
Facilidade de modificação da superfície	Capacidade limitada de co-associar outras moléculas funcionais
Contacto maximizado com mucosas	Perfil de toxicidade desconhecido
Elevada concentração de fármaco no local desejado	Dificuldades na produção em larga escala
Capacidade internalização celular	Baixa estabilidade em alguns fluidos biológicos
Proteção de moléculas encapsuladas	Tendência para agregação
Possibilidade de fornecer uma libertação controlada	Capacidade de carga limitada
Possibilidade de terapêutica direcionada	Tamanho reduzido que pode permitir acesso a locais não intencionais

São vários os métodos que se utilizam para preparar nanopartículas poliméricas. A escolha do método depende de qual é a aplicação final do nanossistema formulado, do tipo de polímero que se está a utilizar e da solubilidade do fármaco a encapsular (57). Entre as técnicas mais frequentemente aplicadas podem referir-se a gelificação iónica, a complexação polieletrólítica, a coacervação e ainda técnicas que envolvem emulsificação (55). Num dos próximos subcapítulos será abordado de uma forma mais detalhada o método de complexação polieletrólítica, por ter sido o utilizado durante o trabalho experimental.

1.3 Compostos bioativos de origem marinha no processo de elaboração de nanopartículas

As matérias-primas de origem marinha têm sido estudadas e exploradas para aplicações várias relacionadas com a produção de sistemas de veiculação de fármacos, em muitos casos nanossistemas, por serem fontes ricas em compostos bioativos que por si mesmos têm um potencial terapêutico e/ou para serem usadas como matriz dos sistemas (58). No presente trabalho as algas e os crustáceos assumiram um papel de relevo ao constituírem a origem dos materiais utilizados na produção de nanopartículas. Nas subsecções seguintes proporciona-se uma descrição mais detalhada do fucoidano e do quitosano (CS), os dois materiais utilizados na produção das nanopartículas.

1.3.1 Fucoidano

As algas *Laminaria ochroleuca* (também conhecida comercialmente por Kombu) e *Himanthalia elongata* (também conhecida comercialmente por Esparguete do Mar) (Figura 1.4) são macroalgas castanhas comestíveis, da classe *Phaeophyceae* (59), encontradas frequentemente na costa portuguesa e no noroeste de Espanha (60,61).



Figura 1.4 – Imagem representativa das algas (a) *Laminaria ochroleuca* e (b) *Himanthalia elongata*. Adaptado de (59).

Destas pode extrair-se uma grande quantidade de compostos bioativos, dos quais se destacam os polissacarídeos sulfatados, como o fucoidano, e ainda os florotaninos, os

minerais, as proteínas e outros biopolímeros com o alginato. Apesar de existirem várias metodologias reportadas para a extração destes compostos das algas, neste trabalho utilizaram-se extratos obtidos através do processo de auto-hidrólise ou extração por água subcrítica, que se trata de um processo pressurizado com água quente a temperaturas superiores a 100 °C (entre os 120 °C e os 220 °C) (61,62). Esta técnica é considerada “amiga do ambiente” quando comparada com outros processos de extração, os quais recorrem frequentemente à utilização de solventes orgânicos, portanto mais agressivos. Assim, trata-se de uma tecnologia mais limpa, uma vez que as condições podem ser controladas para impedir a degradação indesejável de parte dos constituintes durante o processo de extração, seja do próprio fucoídano, seja pela diminuição do teor de fucose e de sulfato (62).

Dos vários compostos presentes nestas algas, os polissacarídeos, para além de constituírem 80% do seu peso (63), têm demonstrado um elevado potencial terapêutico (58). O alginato é um polissacarídeo e um dos compostos bioativos extraído de algas castanhas que tem sido mais estudado. É este componente que permite a flexibilidade e estabilidade das algas contra as correntes marinhas, pelo que se torna interessante no setor farmacêutico como gelificante, espessante e/ou estabilizador (62). O fucoídano, no entanto, é o principal polissacarídeo presente nestas algas e demonstra ter características biológicas muito variadas, incluído efeito antioxidante, anti-inflamatório, antifúngico, antiviral, antidiabético, anticoagulante e antitumoral, assim como propriedades imunomoduladoras (63,64). A atividade biológica do fucoídano pode sofrer alterações de acordo com os diferentes fatores abióticos a que a alga de origem esteja sujeita, como por exemplo, a localização geográfica, as condições de colheita, assim como os métodos de extração que estão inerentes ao processo de obtenção desta matéria prima, que por sua vez influenciará diretamente a composição e estrutura química destes polissacarídeos (61).

De uma maneira geral, o fucoídano tem demonstrado ter imensas atividades biológicas, principalmente na área da oncologia, incluindo uma ampla variedade de efeitos anticancerígenos ainda pouco esclarecidos. Através da literatura, foi possível verificar que o fucoídano pode provocar a interrupção do ciclo celular, apoptose celular, ativação das vias de

sinalização, inibir a angiogénese com a supressão da expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), aumentar o número e atividade das células *natural killer* (NK), reforçar o sistema imunitário e reduzir a capacidade que as células cancerígenas têm de se propagar para outras zonas do organismo (metástases). Para além disso, demonstrou-se que o fucoidano tem efeitos sinérgicos quando utilizado em combinação com outros fármacos utilizados na terapêutica anticancerígena (65).

Desde há muitos anos que o fucoidano é um composto conhecido, no entanto, devido às suas características irregulares e heterogéneas dentro das várias espécies, a sua estrutura química ainda não está totalmente esclarecida (66). A literatura indica várias possibilidades de estrutura para os fucoidanos extraídos de algas marinhas castanhas, a qual depende das suas características de origem, nomeadamente a espécie, origem geográfica, idade e época de colheita (66,67). Para além disso, dentro da mesma espécie de alga pode existir mais do que um tipo de fucoidano. Os modelos mais aceites propuseram que as algas castanhas apresentam na sua parede celular um composto denominado de fucoidano com uma estrutura linear ou ramificada de L-fucopiranosose sulfatada, que pode estar ligada alternadamente por ligações α -(1→3) e α -(1→4), ou apresentar apenas ligações α -(1→3) ou α -(1→4) (67). De acordo com a literatura, o fucoidano proveniente das algas castanhas da ordem Fucales (como a alga *Himanthalia elongata*) apresenta cadeias lineares de L-fucopiranosose ligadas através de ligações glicosídicas α -(1→3) e α -(1→4) alternadas, com grupos sulfato nas posições C-2 e/ou C-4 e muito raramente em C-3. Por outro lado, as algas castanhas da ordem das Laminariales (como a *Laminaria ochroleuca*) contêm fucoidano que apresenta cadeias lineares de L-fucopiranosose ligadas apenas através de ligações glicosídicas α -(1→3), geralmente com substituição por grupos sulfatos no C-4 e/ou por vezes C-2 (66,67). O teor e a posição em que se encontram os grupos sulfato na estrutura química do fucoidano é importante, pois estão diretamente relacionados com as atividades biológicas que os fucoidano podem oferecer (66). Da mesma forma, a solubilidade e a viscosidade do fucoidano estão relacionadas com o nível de ramificação da cadeia estrutural, dependendo do teor de grupos sulfato (66).

Estas estruturas não são, no entanto, alvo de consenso absoluto. Por exemplo, outro estudo mais recente com a alga *Himanthalia elongata* sugere uma estrutura química diferente

do que é tipicamente descrito para a ordem Fucales, assemelhando-se ao que é observado para a ordem dos Laminariales (68). A Figura 1.5 apresenta os modelos mais aceites da estrutura química do fucoidano das várias algas castanhas.

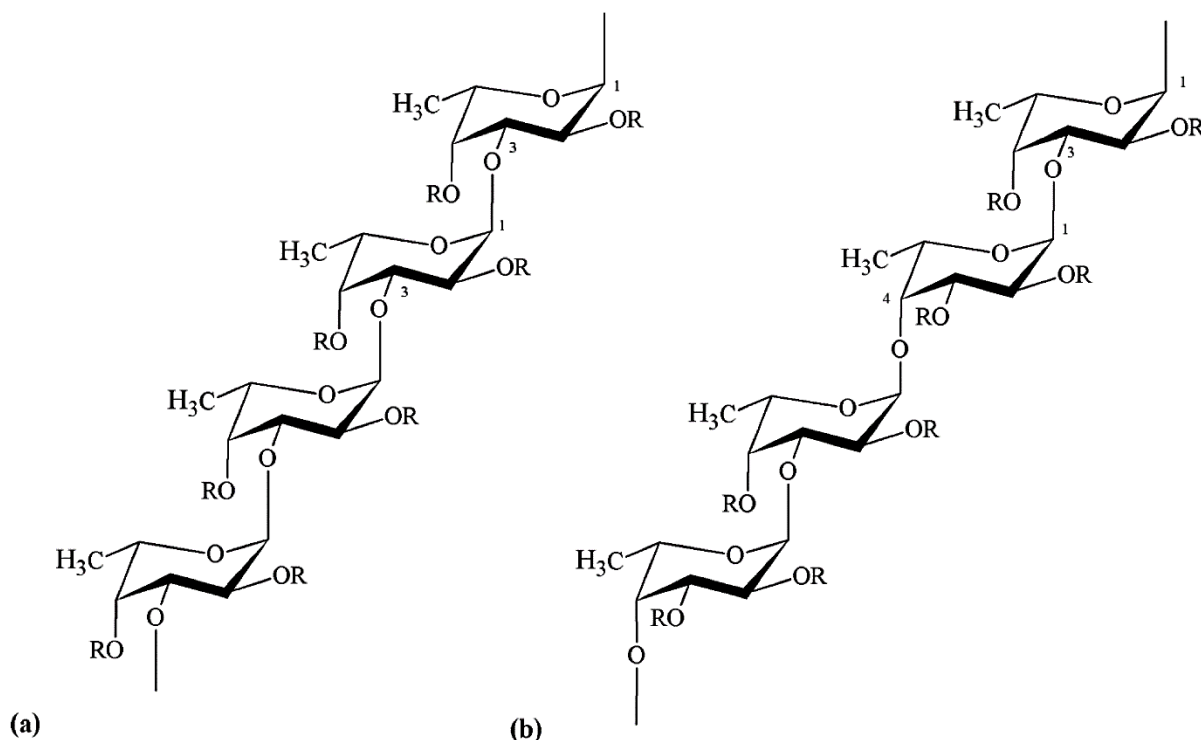


Figura 1.5 – Modelos da estrutura química do fucoidano das várias algas marinhas castanhas pertencentes a ordens taxonómicas Fucales e Laminariales. **(a)** Modelo estrutural de algumas algas da ordem Fucales (C-2 é sempre substituído por um grupo sulfato). **(b)** Modelo estrutural de algumas algas da ordem Laminariales. O R representa as posições de ligação potencial de resíduos de carboidratos (ácido glucurónico, manose, galactose, xilose, α -L-fucose) e substituintes não carboidratos (grupos sulfato e acetato) (66).

A estrutura da molécula de fucoidano apresenta grupos sulfato como constituintes que lhe conferem carga negativa (69), o que atribui ao polímero capacidade de interação com moléculas de carga oposta. Assim, a natureza iónica destes compostos tem permitido a sua utilização em processos de formulação de nanopartículas através do processo de complexação polieletrólítica, um dos métodos mais reportados para a produção de nanopartículas poliméricas à base de fucoidano.

Existe a possibilidade de compra de produtos comerciais de fucoidano como molécula isolada de diferentes matérias-primas como *Fucus vesiculosus*, *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida*, entre outras (70). No entanto, diferentes tecnologias de extração podem ser

utilizadas para obter extratos de algas castanhas ricos em fucoidano. Esses extratos podem ser de potencial interesse, uma vez que não só apresentarão fucoidano, como também poderão ter outros compostos com reconhecida atividade biológica, como os florotaninos e outros anteriormente referidos. A combinação dessas moléculas com fármacos pode criar sinergias e, assim, aumentar o potencial terapêutico, pelo que se torna atrativo trabalhar com estes extratos do ponto de vista biológico.

A bibliografia reporta já a existência de vários trabalhos que envolvem a produção de nanopartículas com base em fucoidano comercial e quitosano (70). A originalidade do presente trabalho centra-se na utilização de extratos ricos em fucoidano como material formador de nanopartículas, os quais são obtidos a partir de algas castanhas por meio de uma tecnologia limpa e amiga do ambiente.

1.3.2 Quitosano

O CS é um polissacarídeo hidrofílico obtido por desacetilação parcial da quitina, através da utilização de uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) (71). A Figura 1.6 representa o processo generalizado de desacetilação da quitina. Este polímero é composto por unidades repetidas, distribuídas aleatoriamente, de cerca 80% de *N*-acetilglucosamina e 20% de *D*-glucosamina, ligadas por ligações β -(1 \rightarrow 4) (Figura 1.7). Esta percentagem pode, no entanto, variar de acordo com a fonte de quitina e com os métodos de processamento utilizados.



Figura 1.6 – Processo de desacetilação de quitina. Adaptado de (72).

A quitina, de que se obtém o CS, encontra-se predominantemente em crustáceos, onde representa cerca de 13-42% da composição da casca. Depois da celulose, a quitina é o segundo

polímero natural mais abundante do planeta (73). O processo de desacetilação consiste na modificação da maioria dos grupos acetilo em grupos amina, o que confere ao CS uma natureza catiónica com capacidade de se solubilizar na maioria dos ácidos diluídos, ao contrário do observado na quitina, que é insolúvel (74).

O CS tem sido consistentemente estudado e explorado para a indústria farmacêutica por apresentar propriedades relevantes e atrativas como tendência para mostrar biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (71). Tem ainda características estruturais que lhe garantem propriedades mucoadesivas que poderá promover a permeação de macromoléculas através de epitélios bem organizados (75). Estas características têm sido usadas favoravelmente no desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos para várias vias de administração como a via de administração oral, administração nasal e administração ocular (76,77).

A biodegradabilidade das matérias-primas é uma propriedade muito importante para o potencial de inclusão em sistemas de veiculação de fármacos. A literatura reporta que, no CS, esta característica está dependente do grau de desacetilação do polímero, verificando-se que quanto menor o grau de desacetilação, mais rápida será a taxa de degradação (78). Assim, deve-se salvaguardar que o CS tenha peso molecular suficientemente reduzido para ser excretado do organismo independentemente da via de administração utilizada.

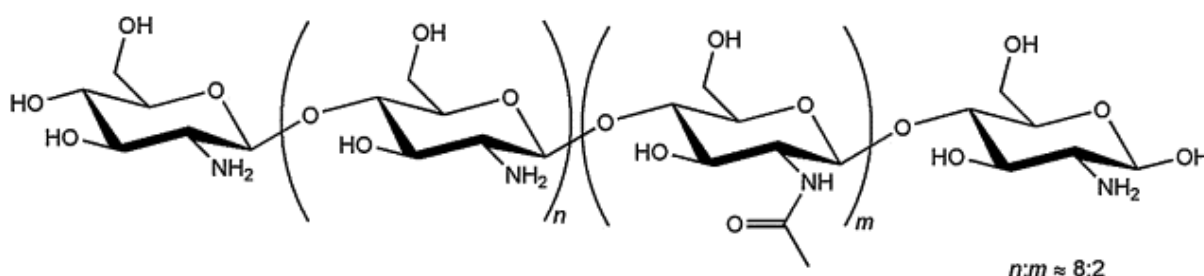


Figura 1.7 – Representação da estrutura química do CS. A estequiometria de n:m é aproximadamente de 8:2. Adaptado de (79).

Para além dos benefícios estruturais, o CS tem também propriedades biológicas muito vantajosas no que diz respeito ao seu uso clínico. De facto, está reportada atividade

antimicrobiana (bactericida e antifúngica), anti-inflamatória, analgésica, hemostática, anticancerígena, antiolesterolêmica, antitumoral, imunoadjuvante, antitrombótica e antioxidante (71,73,74).

Assim, o desenvolvimento de sistemas de veiculação e, particularmente, de nanopartículas, à base de CS suscitou muita atenção para uma ampla gama de aplicações farmacêuticas. Existem estudos de diversos métodos que se podem aplicar na síntese de nanopartículas cuja composição inclui CS, coincidentes com os já referidos anteriormente na abordagem à produção das nanopartículas poliméricas, como a complexação polieletrólítica, gelificação iônica, a coacervação e os métodos que envolvem emulsificação (71,80). Em certos casos, ao introduzir o CS nas nanopartículas verificou-se que o polímero também pode funcionar como agente estabilizador, proporcionando resistência mecânica e capacidade de formação de filmes. Além disso, é um material flexível do ponto de vista químico ou estrutural e apresenta boa relação custo-efetividade, o que justifica as propostas para a sua utilização em diversas aplicações farmacêuticas (71).

1.4 Complexação Polieletrólítica

De acordo com o que foi dito anteriormente, o CS é um dos polímeros naturais mais estudados na produção de nanopartículas poliméricas (80). Após a análise dos vários métodos utilizados para esta finalidade, verificou-se que a complexação polieletrólítica é um dos métodos mais reportados. Os complexos de polieletrólitos (PEC) formados com CS têm vindo a ser reportados para várias aplicações biomédicas e farmacêuticas (81). Por outro lado, também para a produção de nanopartículas de fucoidano este método acolhe grande popularidade, sendo que na maioria dos trabalhos se produzem nanopartículas de fucoidano e CS.

O método de complexação polieletrólítica consiste na mistura de soluções de dois polieletrólitos de cargas opostas, ou seja, um policatião e um polianião. O CS e o fucoidano correspondem a estas estruturas, pelo que a sua utilização conjunta tem sido bastante reportada (82,83). Durante o processo, quando a razão de cargas dos polímeros é igual a 1, ocorre neutralização, o que se traduz em agregação. A existência de carga é, assim, o que garante uma PEC mais estáveis. Desta forma, ambas as soluções de polieletrólitos devem ser diluídas e um dos eletrólitos deve estar em excesso, como se mostra na Figura 1.8 (83).

Geralmente, os PEC e formam um precipitado ou separam-se da solução originando um coacervado (fase líquida rica em complexos) (83). Tendencialmente, os seus tamanhos são variados e os PEC correspondem a formulações com algum grau de polidispersão (80). Ainda assim, podem formar-se PEC solúveis em água quando, sob determinadas condições, os polieletrólitos possuam fracos grupos iónicos e pesos moleculares significativamente diferentes (83).

A produção de nanopartículas utilizando este método depende da capacidade que os polímeros têm de interagir. Como se percebe, as interações eletrostáticas entre os polieletrólitos são fundamentais para a formação de PEC. No entanto, existem outras ligações que podem contribuir para o processo, tais como as pontes de hidrogénio, ligações dipolo-dipolo (81,82), forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas (83).

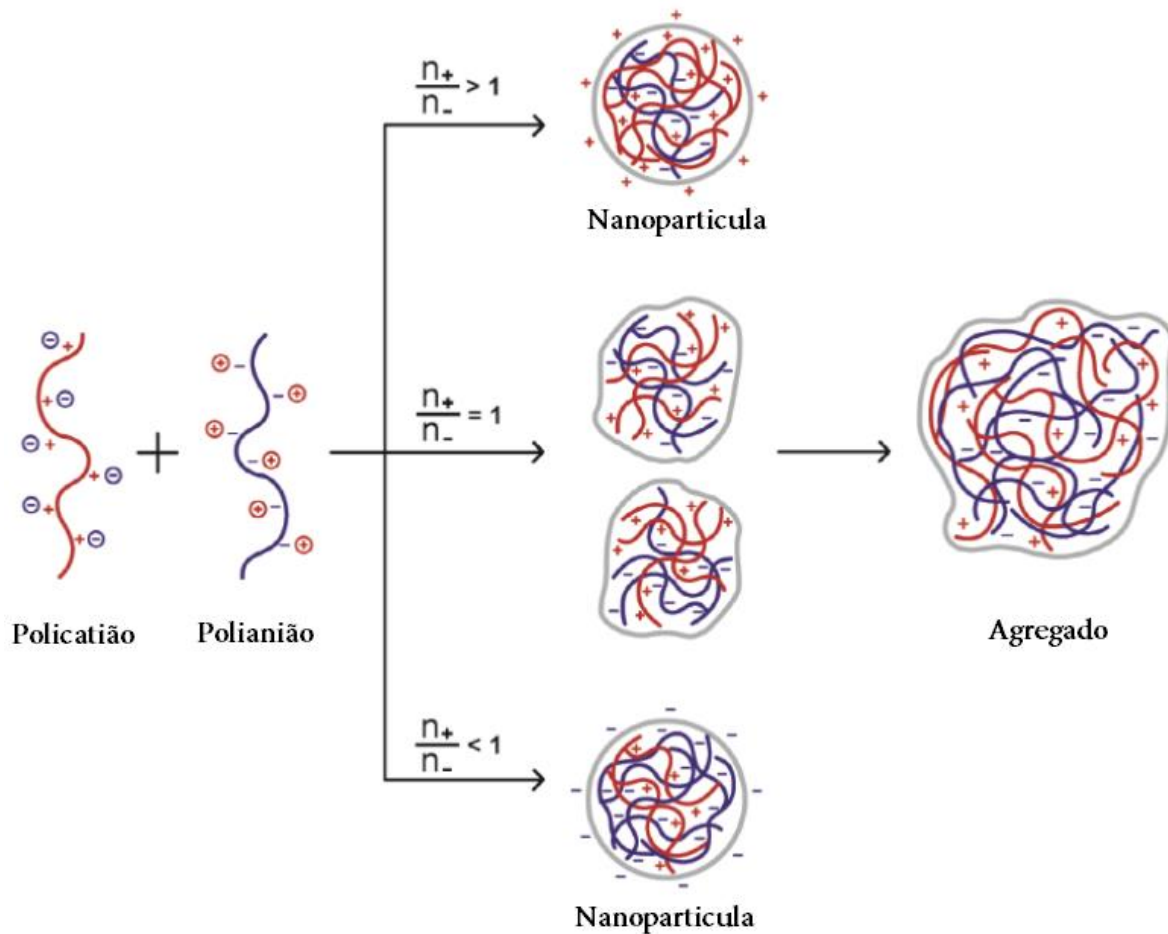


Figura 1.8 – Efeito da carga dos polieletrólitos na carga superficial do complexo de polieletrólitos (PEC) formados. Adaptado de (83).

Esta técnica tem a denominação de complexação polieletrólítica e distingue-se de outros termos por ser induzida por macromoléculas (84). Em geral, os PEC são bem tolerados, biocompatíveis e seguros, o que permite apresentarem claras vantagens como veículos de moléculas de interesse farmacêutico, como por exemplo no controlo da libertação de fármacos (83).

No entanto, são muitos os fatores que afetam a estrutura, quantidade e estabilidade dos PEC, os quais incluem o grau de ionização de cada polieletrólito, a distribuição e densidade de carga das cadeias poliméricas, a concentração dos polieletrólitos, a razão de mistura, a natureza, a posição das cargas iónicas, o peso molecular dos polímeros, a flexibilidade da cadeia polimérica, as condições de temperatura durante o processo, a força iónica, o pH do meio, a hidrofobia e o grau de complexação (81–83).

O procedimento em si é muito simples, consistindo em adicionar uma solução dum polieletrólito sobre uma solução concentrada de outro polieletrólito de carga oposta, sob agitação (82). A formação do PEC é influenciada pela velocidade de adição de um polieletrólito sobre o outro e o tamanho pode ser alterado com a concentração utilizada durante a elaboração do complexo (82). Apesar da aplicação como sistema de veiculação de fármacos ser a mais recorrente, incluindo a distribuição direcionada de ácidos nucleicos e o desenvolvimento de vacinas, os PEC têm suscitado muita atenção nos últimos anos devido a outras potenciais aplicações, como a utilização como membranas de revestimento, bem como o isolamento e fracionamento de proteínas, entre muitos outros (82).

2. Objetivo

O presente trabalho teve como finalidade utilizar compostos de origem marinha para a produção de nanopartículas com potencial interesse terapêutico. O principal objetivo foi verificar a possibilidade de utilizar extratos de algas castanhas contendo fucoïdano para a formação de nanopartículas, recorrendo à técnica de complexação polieletrólítica. Para o efeito, foram utilizadas duas algas comestíveis, *Laminaria ochroleuca* e *Himanthalia elongata*. Pretendeu-se ainda determinar o efeito da temperatura de produção dos extratos na sua capacidade de formação de nanopartículas poliméricas.

A análise foi realizada avaliando as características físico-químicas das nanopartículas desenvolvidas, nomeadamente através da determinação do tamanho e distribuição de tamanho, da carga superficial (potencial zeta) e do rendimento de produção das nanopartículas.

3. Materiais e Métodos

3.1 Matérias-primas

Foram utilizados extratos de fucoidano (FUCe), obtidos por um processo de extração com água pressurizada a diferentes temperaturas (85), a partir das algas marinhas *Laminaria ochroleuca* e *Himanthalia elongata*. Este processo de extração foi realizado em laboratório na Universidade de Vigo (Espanha), grupo EQ2 “*Biomasa y desarrollo sostenible*” (61,62).

3.2 Reagentes

Utilizou-se CS de baixo peso molecular (grau de desacetilação \approx 75–85%) adquirido à Sigma-Aldrich (Alemanha). O ácido acético glacial (CH₃COOH) foi adquirido à Merck (Alemanha). Foi utilizada água ultrapurificada (Milli-Q®, Portugal) ao longo de todo o trabalho.

3.3 Equipamentos

Na Tabela 3.1 encontra-se uma listagem de todos os equipamentos utilizados na elaboração do trabalho experimental, assim como a respetiva marca e modelo.

Tabela 3.1 – Registo da marca e modelo dos equipamentos utilizados

Equipamento	Marca (país)	Modelo
Zetasizer®	Malvern PanAlytical (Reino Unido)	Nano-ZS
Balança Analítica	Kern (Alemanha)	ABT 120-5DM
Centrifuga	Hettich (Alemanha)	Mikro 200R
Liofilizador	Labconco (Estados Unidos)	FreeZone 6Plus

3.4 Produção das nanopartículas

Neste trabalho experimental foram utilizados os extratos das algas *Laminaria ochroleuca* e *Himanthalia elongata*, denominados FUCe, obtidos por um processo de extração com água subcrítica realizado a diferentes temperaturas, nomeadamente 120 °C, 160 °C e 220 °C. Para preparação das nanopartículas, o FUCe de cada alga obtido a diferentes temperaturas, foi dissolvido em água ultrapura à temperatura ambiente e posteriormente filtrado (acetato de celulose, 0,45 μm , Frilabo, Portugal) antes da sua utilização. Para cada tipo de FUCe foi preparada uma solução mãe de 10 mg/mL, que foi posteriormente diluída para obter soluções com as concentrações necessárias, entre 0,625 e 2,5 mg/mL. O CS foi dissolvido em ácido acético a 1% (v/v) de forma a obter uma solução de 1 mg/mL, sendo posteriormente filtrado a vácuo utilizando papel de filtro (5-15 μm , VWR, França).

As nanopartículas foram preparadas por uma técnica de complexação polieletrólítica, utilizando-se as soluções dos materiais preparadas de acordo com a descrição acima, e testando-se os rácios de massa de CS/FUCe correspondentes a 4/1, 1/1 e 1/4. A Tabela 3.2 é descritiva das condições testadas para produção das nanopartículas. No Anexo 7.1 está descrito com maior detalhe os volumes e concentrações de todos os componentes utilizados na preparação das nanopartículas CS/FUCe.

Tabela 3.2 – Algas de origem e temperaturas de extração utilizadas para produção de nanopartículas com diferentes rácios de massa entre os extratos de fucoídano (FUCe) e quitosano (CS).

Alga de Origem	T _{extração} FUCe (°C)	CS/FUCe (m/m)
<i>Laminaria ochroleuca</i>	120	4/1 ; 1/1 ; 1/4
	160	4/1 ; 1/1 ; 1/4
<i>Himanthalia elongata</i>	220	4/1 ; 1/1 ; 1/4

CS: quitosano; FUCe: extrato de fucoídano; T_{extração} FUCe: Temperatura de extração de FUCe.

A mistura dos polímeros foi realizada através da incorporação lenta de 0,8 mL das diferentes soluções de FUCe sobre 2 mL da solução de CS à concentração de 1 mg/mL, sob agitação magnética, à temperatura ambiente durante 10 minutos. A Figura 3.1 ilustra todo o processo de preparação das nanopartículas por complexação polieletrólítica.

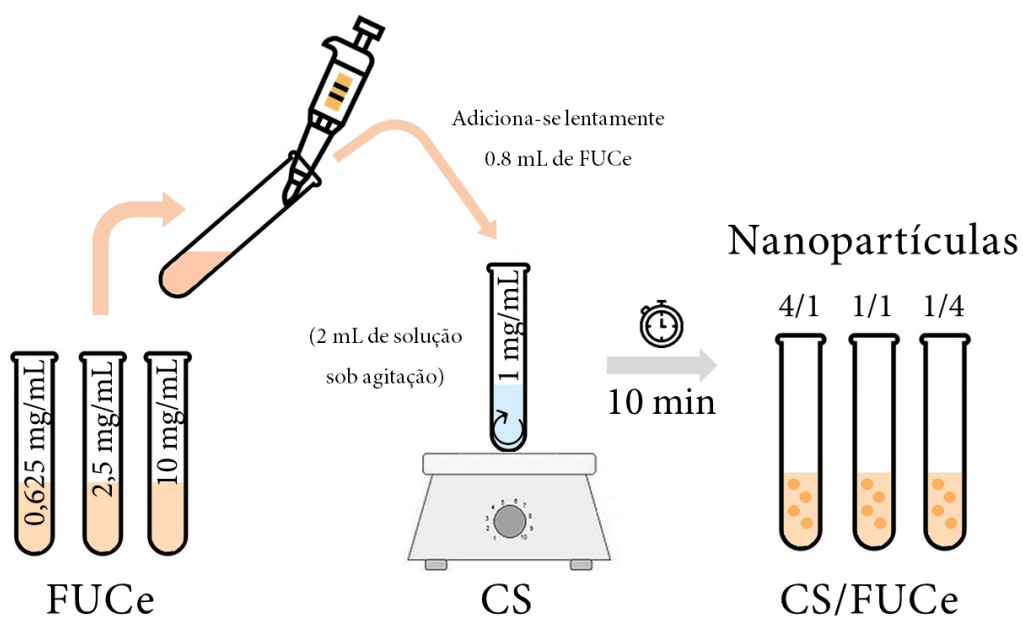


Figura 3.1 – Representação esquemática do processo de formulação das nanopartículas CS/FUCe por complexação polieletrólítica.

3.5 Caracterização das nanopartículas

3.5.1 Propriedades físico-químicas

As nanopartículas preparadas foram caracterizadas quanto ao seu tamanho e índice de polidispersão por uma técnica de dispersão dinâmica da luz (DLS, do inglês “*Dynamic Light Scattering*”), tendo-se caracterizado o potencial zeta por eletroforese de laser Doppler. Para estas análises foi utilizado o Zetasizer® (Nano ZS, Malvern, Reino Unido), tendo-se utilizado 40 μL de cada amostra de nanopartículas, que se diluíram em 1 mL de água ultrapurificada previamente filtrada (0.22 μm , material PVDF, Millipore Millex-GV, Alemanha). As amostras foram colocadas em células adequadas para as respectivas medições ($n \geq 3$).

3.5.2 Rendimento de produção das nanopartículas

Numa primeira abordagem, foram estabelecidos critérios de seleção das nanopartículas produzidas. As amostras em que se verificava a ocorrência de efeito Tyndall, foram selecionadas para a realização do estudo do rendimento de produção. As preparações que não apresentaram efeito Tyndall foram excluídas do estudo deste parâmetro.

Depois de produzidas de acordo com o procedimento descrito na secção 3.4, as nanopartículas foram sujeitas a um processo de centrifugação a 16000 xg durante 30 min a 15 °C (Mikro 200R, Hettich, Alemanha), sendo o sobrenadante desprezado. As amostras foram congeladas a -80 °C e, posteriormente, liofilizadas (FreeZone 6Plus, Labconco, Kansas City, MO, USA). As condições de liofilização incluíram temperatura entre -55 °C e -85 °C, utilizando uma pressão de 11 Pa, tendo o processo decorrido durante 72 h.

O rendimento de produção das nanopartículas (η) foi calculado com a seguinte fórmula:

$$\eta (\%) = \frac{\text{massa nanopartículas}}{\text{massa total dos sólidos}} \times 100$$

em que η corresponde ao valor de rendimento em percentagem, **massa nanopartículas** corresponde ao valor de massa da amostra após a liofilização e **massa total de sólidos**

corresponde à massa total de constituintes sólidos utilizados para a elaboração das nanopartículas.

3.5.3 Análise estatística

Para a análise dos resultados das características das nanopartículas obtidas, foi realizado um teste de comparações múltiplas de Dunn's, por análise de variância unilateral (ANOVA), utilizando o software estatístico Graphpad Prism® (Versão 9.2.0). As diferenças foram consideradas significativas a um nível de $p < 0.05$.

4. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados obtidos ao longo do trabalho, que teve como foco a formulação de nanopartículas a partir de extratos de origem marinha obtidos de duas algas castanhas comestíveis, os quais contêm fucoidano (FUCe), e de um polímero comercial, amplamente estudado para aplicações na área da veiculação de fármacos, o CS.

Os extratos das algas escolhidos para este trabalho foram caracterizados anteriormente em trabalhos já publicados (61,62). A informação relacionada com a composição é um fator determinante para conhecer as propriedades que os extratos podem ter em termos da sua capacidade de formulação de nanopartículas poliméricas pelo método de complexação polieletrólítica. Para esta capacidade contribui em larga medida a determinação da densidade de carga, que assume particular importância neste método.

A complexação polieletrólítica, utilizada neste trabalho, é um processo que envolve interações eletrostáticas entre o FUCe, que possui grupos sulfato carregados negativamente, e o CS, que tem na sua estrutura grupos amina carregados positivamente. Quando se misturam soluções de ambos os polímeros, ocorre um fenómeno denominado de complexação polieletrólítica, que acontece de forma instantânea e que corresponde essencialmente a interações entre as cadeias poliméricas dos dois materiais utilizados, de cargas opostas. Dessa interação resulta a formação das nanopartículas poliméricas, a que foi atribuída a designação de CS/FUCe.

4.1 Caracterização das nanopartículas

O processo de produção de nanopartículas focou-se experimentalmente na avaliação do efeito de utilizar soluções de diferentes concentrações de FUCe, de duas algas distintas, as quais foram adicionadas a uma solução de CS a concentração e volume constante. Sendo o volume da solução de FUCe mantido igualmente constante, avaliaram-se concentrações de FUCe que resultaram em rácios de massa de CS/FUCe = 4/1, 1/1 e 1/4. Assim, foi possível estudar o efeito que ocorre ao aumentar a concentração de FUCe.

Após a produção das nanopartículas de CS/FUCe de acordo com a metodologia anteriormente descrita, foi realizada uma caracterização físico-química das mesmas, tendo-se avaliado os parâmetros tamanho, índice de polidispersão (distribuição de tamanho) e potencial zeta. Além disso, foi ainda calculado o rendimento de produção das diferentes formulações de nanopartículas preparadas. Todos os resultados obtidos foram descritos no Anexo 7.2 para os extratos obtidos das duas algas estudadas.

O tamanho das nanopartículas é um dos fatores mais críticos destes sistemas, pois afeta de forma direta as eventuais aplicações na área farmacêutica, estando relacionado com a via de administração que se pretende utilizar, com o tempo de semivida das nanopartículas durante a circulação sanguínea, a chegada aos alvos terapêuticos e a internalização celular (86). A elevada superfície de contacto das nanopartículas de menor tamanho permite uma maior capacidade de interação com as células, o que poderá favorecer abordagens inovadoras a nível terapêutico numa potencial aplicação nessa vertente (71) e justifica que tipicamente se pretendam obter nanopartículas de tamanhos reduzidos.

Em paralelo, o índice de polidispersão (Pdl) é um parâmetro utilizado para descrever o grau de dispersão da distribuição de tamanho das nanopartículas. Idealmente, as nanopartículas devem apresentar homogeneidade de tamanho, o que se traduz em populações monodispersas. No entanto, este parâmetro nem sempre é fácil de controlar, sendo afetado por uma série de parâmetros que incluem, entre outros, a composição da matriz, a natureza dos solventes utilizados e o tipo de método selecionado para a preparação. O valor numérico

de Pdl varia entre 0 (para uma amostra perfeitamente uniforme, monodispersa, em relação ao tamanho das partículas) e 1 (o que caracteriza uma amostra altamente polidispersa com múltiplas populações de partículas de diferentes tamanhos) (87). A Figura 4.1 representa esquematicamente a relação entre o tamanho das partículas e os valores de Pdl, onde se pode observar a diferença entre uma amostra de partículas polidispersa e uma amostra de partículas monodispersa.

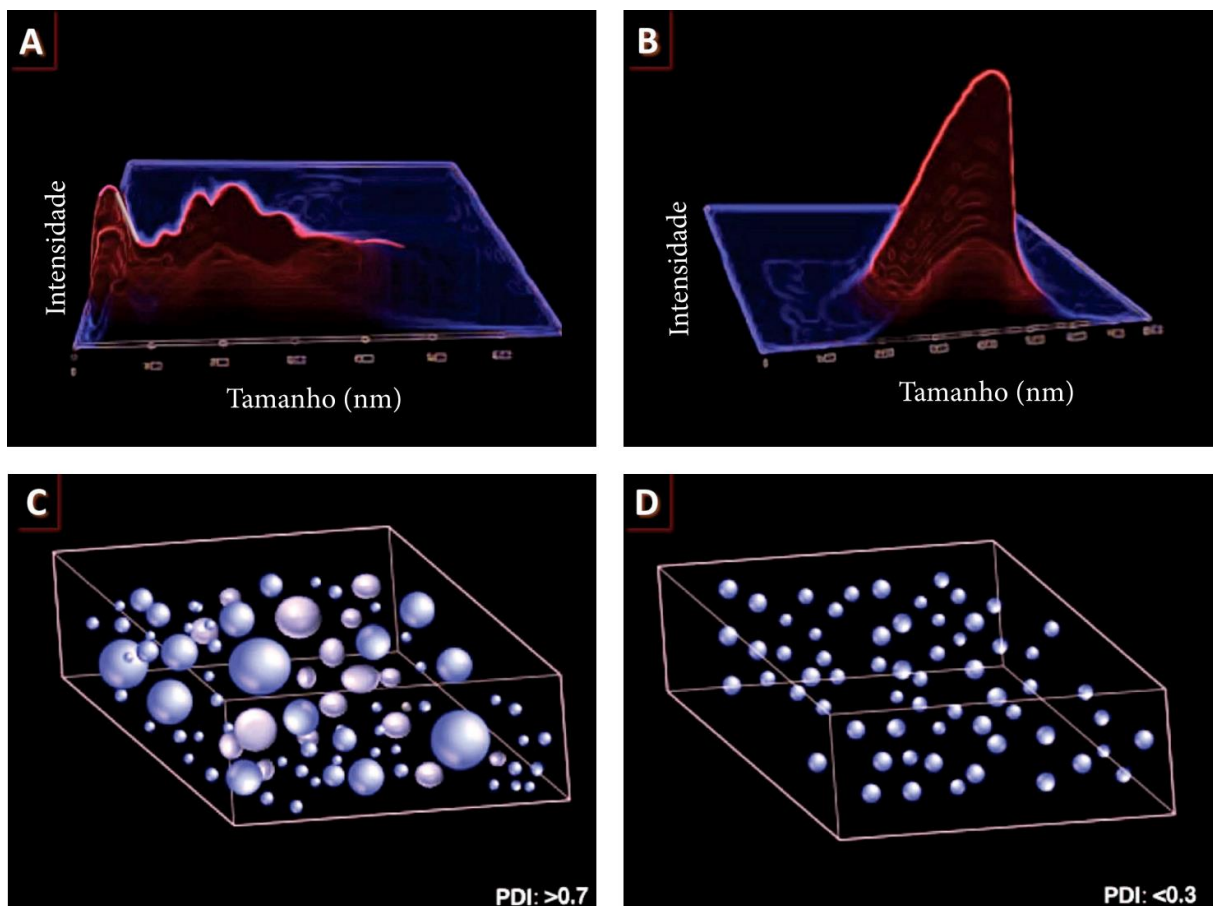


Figura 4.1 – A e B: Representação esquemática do tamanho de partículas de uma polidispersão (A) e de uma monodispersão (B). C e D: Representação esquemática da distribuição de tamanho de partículas de uma amostra com partículas polidispersas (Pdl > 0,7) (C) e de uma amostra com partículas monodispersas (Pdl < 0,3) (D). Adaptado de (87), estudo de nanossistemas lipídicos.

O potencial zeta é o parâmetro que permite avaliar a carga superficial das nanopartículas analisadas. Quando as nanopartículas estão em dispersão num líquido, a carga medida é na realidade a da camada estacionária de fluido ligada à partícula em dispersão. As características superficiais das nanopartículas são muito importantes no que se refere à sua distribuição e interação com as estruturas envolventes. Quando após a administração

alcançam a corrente sanguínea, as nanopartículas podem sofrer rapidamente o processo de opsonização, o que culminará rapidamente numa eliminação pelos macrófagos. O sistema reticuloendotelial, presente em todo o organismo, mas com prevalência no fígado e baço, é um dos grandes obstáculos para a chegada das nanopartículas aos locais de ação pois tem a capacidade de reconhecer e remover os sistemas de veiculação da circulação sistêmica, evitando conseqüentemente que os fármacos associados cheguem aos locais alvo. Não obstante essa tendência natural para opsonização e conseqüente eliminação, a carga superficial das nanopartículas desempenha um papel fundamental na interação celular e, conseqüentemente, na potencial internalização. As membranas celulares possuem na sua estrutura glicosaminoglicanos (GAG's) e resíduos de ácido siálico que atribui carga negativa (88). Este potencial negativo das células favorece o estabelecimento de interações eletrostáticas com nanopartículas que exibam carga superficial positiva, promovendo a sua ligação e eventual internalização (89).

O potencial zeta tem também uma grande influência na estabilidade dos sistemas nanoparticulados. Quanto mais elevado for o valor absoluto do potencial zeta, maior estabilidade terá a formulação de nanopartículas, já que a existência de carga assegura o afastamento das nanopartículas umas das outras, fruto da repulsão eletrostática, o que contribui para impedir a sua agregação. A bibliografia descreve uma classificação da estabilidade das nanopartículas em função do seu potencial zeta, classificando-as como altamente instáveis (potencial zeta de $\pm 0-10$ mV), relativamente estáveis ($\pm 10-20$ mV), moderadamente estáveis ($\pm 20-30$ mV) e altamente estáveis ($> \pm 30$ mV) (90).

As nanopartículas são sistemas coloidais que se caracterizam por exibir algumas propriedades diferenciadoras face a outros sistemas em dispersão, como as suspensões. Uma dessas características diz respeito a uma propriedade ótica e consiste na capacidade de dispersão de luz para nanopartículas cujo diâmetro supera o comprimento de onda da luz incidente. Essa capacidade de dispersão de luz traduz-se num aspeto turvo das formulações de nanopartículas e é tipicamente denominada efeito Tyndall (91). Quando o efeito Tyndall é reduzido, sendo a dispersão de nanopartículas mais transparente, isso é indicador de reduzida

formação de nanopartículas, ou seja, um baixo rendimento de produção. Ao contrário, uma turvação elevada, que corresponde a um efeito Tyndall notório, indica um rendimento de produção mais elevado. Assim, a observação macroscópica desse parâmetro permite ter uma noção quase imediata das condições de preparação que permitem obter uma maior quantidade de nanopartículas. Esse foi um dos primeiros aspetos registados na produção das nanopartículas nas condições selecionadas para este estudo. As formulações que demonstraram ter efeito Tyndall foram as NP CS/FUCe = 1/4 (m/m) produzidas com extrato de *Laminaria ochroleuca* obtido a 160 °C e as NP CS/FUCe = 1/1 (m/m) com extrato de *Himanthalia elongata* obtido quer a 120 °C, quer a 160 °C. Desde logo se percebeu que a composição de cada extrato afeta naturalmente a capacidade de formação de nanopartículas, a qual está favorecida para extratos que tenham maior quantidade de grupos sulfato (61,62), uma vez que essa é a variável mais notória, tendo em conta que a quantidade de CS se mantém sempre constante.

Abaixo detalham-se as características determinadas para as várias formulações de nanopartículas preparadas.

4.1.1 Nanopartículas elaboradas com extratos de *Laminaria ochroleuca*

O efeito da utilização de extratos obtidos a diferentes temperaturas e também de diferentes concentrações de extrato, estas últimas materializadas em diferentes razões de massa CS/FUCe, foi testado para cada uma das algas avaliadas. A Figura 4.2 apresenta os resultados de tamanho das nanopartículas formuladas com extrato da alga *Laminaria ochroleuca*. Verifica-se que tanto a temperatura de extração da alga como as concentrações de extrato utilizadas afetam o tamanho das nanopartículas ($p < 0.05$).

A observação generalizada dos dados de tamanho indica que as nanopartículas CS/FUCe = 4/1 apresentam os valores mais elevados para cada um dos extratos utilizados. Os tamanhos reduzem-se depois para a razão de massa 1/1, não se alterando de forma geral quando as nanopartículas são produzidas com CS/FUCe = 1/4. Assim, com pequenas exceções, existem diferenças de 4/1 para 1/1 e de 4/1 para 1/4, sugerindo que há um decréscimo de tamanho com o aumento da quantidade de FUCe presente nas nanopartículas.

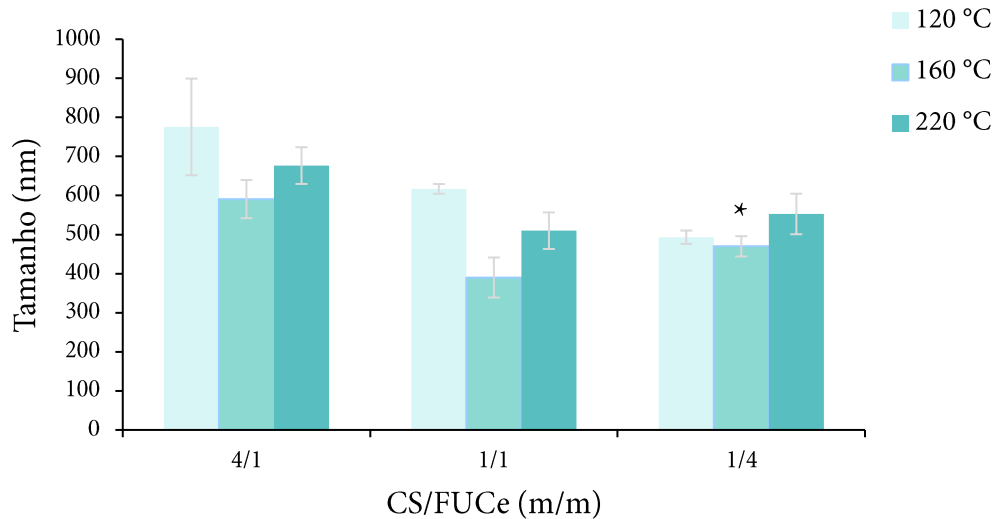


Figura 4.2 - Tamanho médio das nanopartículas quitosano/fucoidano (CS/FUCe = 4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga *Laminaria ochroleuca* obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n \geq 3$). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.

Ao analisar o peso molecular dos compostos, a literatura refere que o CS utilizado neste trabalho tem um peso molecular de cerca de 169 kDa (79). Por outro lado, é indicado que o FUCe da *Laminaria Ochroleuca* obtido a temperaturas de extração mais reduzidas (70-100 °C) apresenta um peso molecular de cerca de 12 kDa (64) e a uma temperatura de 220 °C de aproximadamente 80 kDa (62), em todo o caso sempre bastante mais baixo do que o CS. O protocolo de preparação das nanopartículas neste trabalho, envolve a utilização duma quantidade constante de um polímero com cadeias poliméricas maiores (CS), a que se adiciona uma pequena quantidade de FUCe. As interações promovidas entre cadeias de características tão diferentes podem ser aleatórias e, principalmente quando a quantidade de FUCe é muito pequena, podem formar-se alguns agregados maiores que não correspondem exatamente a uma formação contínua e homogénea de nanopartículas, o que justifica o aumento do tamanho nas razões de massa CS/FUCe = 4/1. Este comportamento também foi observado em formulações desenvolvidas com extratos das mesmas algas castanhas, mas obtidos a menores temperaturas (64).

Por outro lado, como já referido anteriormente, o efeito Tyndall foi observado principalmente na formulação CS/FUCe = 1/4 preparada com FUCe obtido a 160 °C, o que indica formação de nanopartículas. A razão de massa utilizada neste caso corresponde à que

envolve maior quantidade de FUCe, favorecendo assim a ocorrência de interações eletrostáticas em quantidade suficiente para resultar na formação de nanopartículas poliméricas de uma forma mais consistente e com tamanhos mais constantes ($PdI = 0,285$). O mesmo não acontece com os FUCe obtidos a 120 °C e 220 °C, o que pode ser explicado pela composição dos extratos utilizados. De facto, estudos anteriores mostraram uma degradação do polímero e, conseqüentemente, menor quantidade de sulfato, particularmente para o FUCe obtido a 220 °C, mas também a 120 °C se verifica a existência de menor quantidade de grupos sulfato disponíveis, o que limita a interação com o CS, essencial para a produção de nanopartículas (62).

De forma geral não se observam diferenças significativas quando, para uma mesma razão de massa, se compara o efeito de utilizar extratos obtidos a temperaturas diferentes, exceto para CS/FUCe = 1/1 em que se verificou uma diferença significativa de tamanho entre as nanopartículas formuladas com FUCe extraído à temperatura de 120 °C e 160 °C ($p < 0,05$), com tamanho mais reduzido para o extrato de 160 °C. O mesmo estudo prévio já referido anteriormente identificou que a maior quantidade de fucoídano (maior teor de fucose e sulfato) é registada nos extratos obtidos a 160 °C (62). O facto de existir uma maior concentração de fucoídano pode promover uma maior interação entre os sulfatos (presentes no fucoídano, logo no FUCe) e as aminas (presentes em CS). Na análise geral, as nanopartículas que apresentaram o tamanho mais reduzido foram as CS/FUCe = 1/1 produzidas com extrato obtido a 160 °C, revelando um tamanho médio de 390 nm e um Pdl de 0,390. Este último parâmetro (Pdl – polidispersão) é, como referido anteriormente, de grande relevância na caracterização, indicando a distribuição de tamanhos. Tal como mostrado na Tabela 4.1, verifica-se que, de forma geral, ocorre uma diminuição do Pdl em paralelo à diminuição do tamanho e ao aumento da concentração de FUCe nas nanopartículas. Isto indica que as formulações com maior concentração de FUCe apresentam menor polidispersão. Todas as amostras em análise resultaram em valores de Pdl dentro de intervalos adequados para caracterização, o que está geralmente associado ao limite superior de 0,7 (87). As formulações CS/FUCe = 1/4 - 160 °C e CS/FUCe = 1/4 - 120 °C, foram as que apresentaram menores valores de polidispersão, respetivamente de 0,285 e 0,276. É relevante

sobretudo para a formulação preparada com o extrato obtido a 160 °C, dada a verificação de produção efetiva de nanopartículas, tendo em conta o efeito Tyndall observado.

Tabela 4.1 – Índice de polidispersão (Pdl) das nanopartículas CS/FUCe formuladas com *Laminaria ochroleuca* (média ± desvio padrão; n ≥ 3). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall estão assinaladas com *.

T _{extração} FUCe (°C)	CS/FUCe (m/m)	Pdl
120	4/1	0,596 ± 0,023
	1/1	0,426 ± 0,162
	1/4	0,276 ± 0,075
160	4/1	0,486 ± 0,033
	1/1	0,390 ± 0,127
	1/4 *	0,285 ± 0,020
220	4/1	0,650 ± 0,082
	1/1	0,521 ± 0,069
	1/4	0,546 ± 0,103

CS: quitosano; FUCe: extrato de fucoidano; T_{extração} FUCe: Temperatura de extração de FUCe.

O potencial zeta é um parâmetro de grande importância, já que proporciona indicações sobre a potencial estabilidade da formulação (90), bem como sobre a sua capacidade de interação com as estruturas do organismo, como as células (89). O potencial zeta traduz a carga superficial das partículas. A Figura 4.3 apresenta os resultados obtidos para o potencial zeta das nanopartículas formuladas, com base na qual se verifica que tanto a temperatura de extração da alga como as concentrações de extrato utilizadas afetam a carga superficial das nanopartículas ($p < 0.05$).

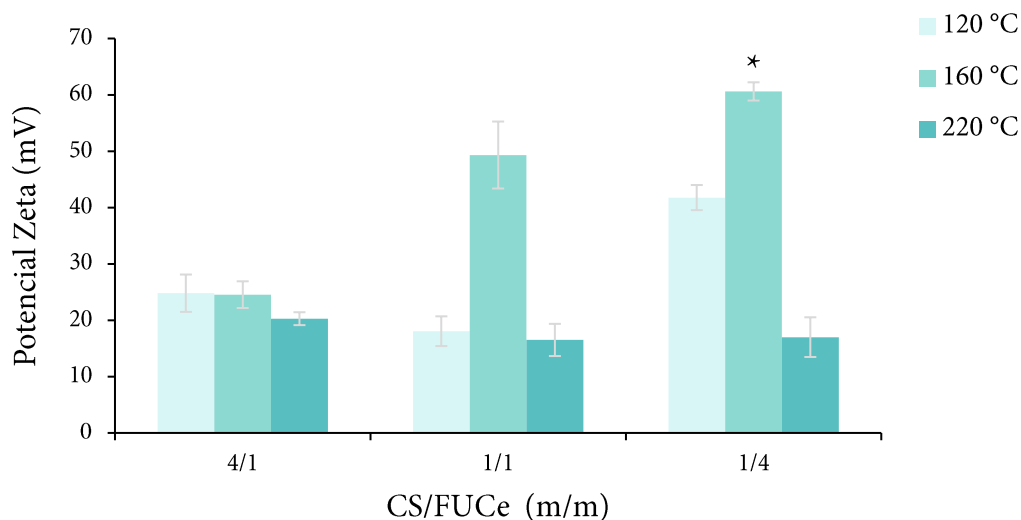


Figura 4.3 - Potencial zeta médio das nanopartículas CS/FUCe (4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga *Laminaria ochroleuca* obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n \geq 3$). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.

Ao analisar o resultado do potencial zeta para as nanopartículas verificou-se que todas as formulações exibiram carga positiva, mesmo quando a quantidade de FUCe, que terá carga negativa, se sobrepõe à de CS. Esta observação é indicativa do facto da densidade de carga do CS ser mais elevada do que a do FUCe, tal como já foi observado em trabalhos anteriores (64).

As nanopartículas CS/FUCe = 4/1 não registam alterações de potencial zeta em função da utilização de extratos obtidos a temperaturas diferentes, situando-se em todos os casos à volta dos + 20-25 mV. Já nas nanopartículas CS/FUCe = 1/1 e 1/4, o potencial zeta foi bastante mais elevado (+50 a +60 mV) para a formulação preparada com extrato obtido a 160 °C, que já tinha sido evidenciado anteriormente por originar as nanopartículas de menor tamanho e de maior homogeneidade de tamanhos. Este efeito é inesperado, uma vez que estudos anteriores (62) indicaram que a 160 °C se obtém o extrato com maior quantidade de sulfato. O expectável seria, então, que existisse maior interação entre os grupos sulfato e os grupos amina do CS, conduzindo a uma maior neutralização. Claramente esse não é o efeito ocorrido, aumentando o potencial zeta de CS/FUCe = 4/1 para 1/1 e 1/4 ($p < 0.05$). Uma possível explicação poderá estar no facto de este estudo envolver a utilização de extratos complexos dos quais não foram isolados os componentes cuja interação assegura a produção das nanopartículas. Assim, é conhecida a presença de outros componentes para além do

fucoídano, que incluem glicose, galactose, xilose, etc., que podem camuflar parte das cargas negativas, criando um efeito de escudo, tornando-as indisponíveis para a interação com o CS. Para além disso, como há uma grande diferença no tamanho das cadeias poliméricas, as cadeias menores de fucose talvez encontrem dificuldades em percorrer a grande cadeia de CS para aceder à superfície das nanopartículas e, assim, interferir na carga superficial (62).

Foi igualmente observado que a utilização dos extratos obtidos a 220 °C conduziu a diferenças significativas ($p < 0.05$) para as NP CS/FUCe = 1/1 e 1/4, na comparação com extratos obtidos a 160 °C. Significa que o aumento da temperatura de extração modifica a quantidade de cargas que possam estar disponíveis para formular nanopartículas. Tendo em conta este comportamento inesperado, ao analisar os dados publicados no que diz respeito aos espetros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de extratos obtidos da *Laminaria ochroleuca*, a Figura 4.4 mostrou que quanto menor é a temperatura de extração, mais marcada é a banda obtida entre 1240-1260 cm^{-1} que pode estar relacionada com a existência de grupos sulfato, exceto nos extratos obtidos a 220 °C (62,64). Através de análise deste estudo em que foi caracterizada a quantidade de compostos extraídos da alga *Laminaria ochroleuca*, no caso dos extratos obtidos à temperatura de 220 °C, estão presentes quantidades relevantes de grupos sulfato, mas quantidades muito pequenas de fucose, pelo que se entende que não exista propriamente uma elevada quantidade de fucoídano. No entanto, a esta temperatura verificou-se uma elevada quantidade de galactose e xilose, pelo que se considera que os sulfatos possivelmente estejam ligados a esses oligossacarídeos (62). Com mais estudos feitos neste sentido, poderia ser explicado o menor valor de potencial zeta que é obtido no extrato a 220 °C quando comparado com os resultados das nanopartículas formuladas com extratos obtidos a 160 °C. Há ainda a realçar o facto de que a determinação de sulfatos é realizada com uma técnica que envolve uma hidrólise e permite quantificar a totalidade dos sulfatos existentes. No entanto, não pode assumir-se de forma linear que todos esses sulfatos estarão disponíveis para a interação, o que poderá ser uma justificação para os resultados obtidos.

De facto, as nanopartículas preparadas com FUCe obtido a 220 °C registaram constância do valor de potencial zeta mesmo após o aumento da concentração de FUCe.

Possivelmente, será o extrato com a menor quantidade de fucoidano devido à eventual degradação a elevadas temperaturas, sendo possível que a carga existente seja muito semelhante nos vários extratos, proporcionando a formulação de nanopartículas com características semelhantes mesmo quando se variam as razões de massa.

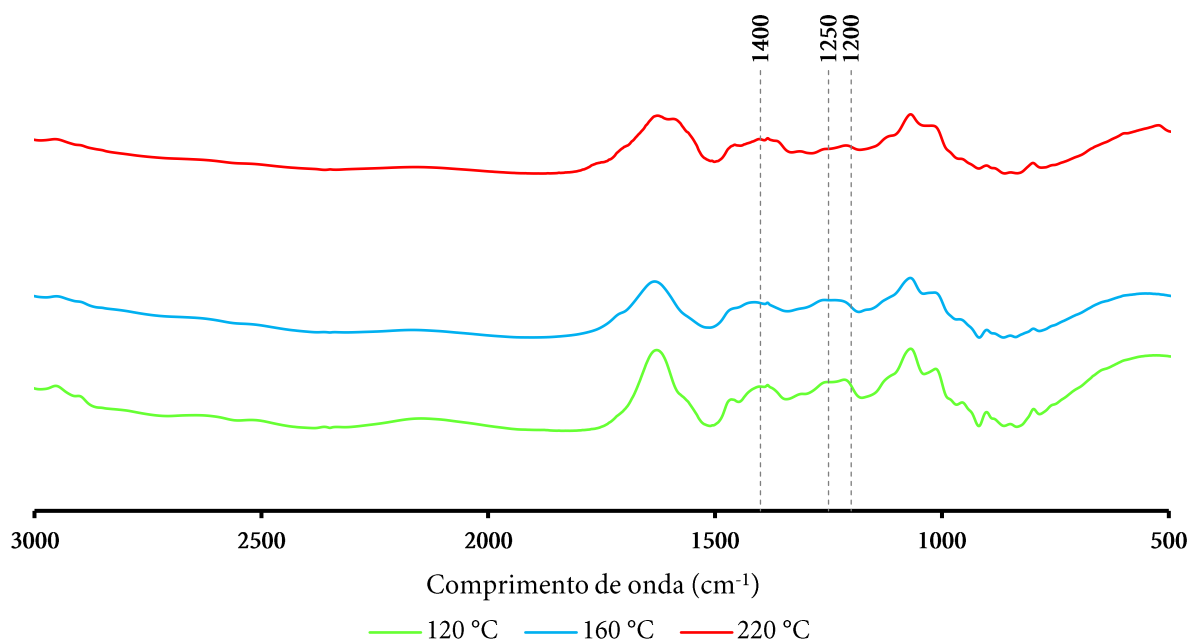


Figura 4.4 - Espectro FTIR de extratos bioativos obtidos por auto hidrólise de *Laminaria ochroleuca* a diferentes temperaturas de extração. Adaptado de (62).

Como referido anteriormente, foi determinado o rendimento de produção para as nanopartículas em que se observou efeito Tyndall visível. Foi realizado um processo de liofilização, que permitiu a eliminação da água existente por sublimação, secando assim as amostras. As amostras obtidas após liofilização estão representadas na Figura 4.5. A imagem sugere desde logo que algumas amostras apresentam maior quantidade de nanopartículas do que outras.

Nas nanopartículas formuladas com FUCe de *Laminaria ochroleuca*, apenas a formulação CS/FUCe = 1/4 formulada com extrato obtido a 160 °C apresentou efeito Tyndall, ainda que considerado ligeiro. Em linha com essa observação, o rendimento de produção foi baixo, de $4,3 \pm 1,5$ %.



Figura 4.5 - Eppendorfs relativos a amostras de nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos obtidos de *Laminaria ochroleuca* e *Himanthalia elongata* após liofilização. 5C - CS/FUCe = 1/4, 160 °C *Laminaria ochroleuca*; 7C - CS/FUCe = 1/1, 160 °C *Himanthalia elongata*; 8C - CS/FUCe = 1/1, 120 °C *Himanthalia elongata*. Amostra 6C não relevante para o trabalho em questão.

4.1.2 Nanopartículas elaboradas com extratos de *Himanthalia elongata*

Um procedimento semelhante ao utilizado com o extrato anterior foi aplicado nos extratos da alga *Himanthalia elongata* para preparação das nanopartículas. Ao formular as nanopartículas CS/FUCe = 1/4 utilizando os extratos obtidos a 120 °C e 160 °C, verificou-se que nessas amostras ocorreu a formação de um precipitado (Figura 4.6) o que impossibilitou a continuação dos ensaios com estas formulações em específico. Ambos os casos correspondem a nanopartículas formuladas com a maior concentração de extrato de alga testada, sendo por isso maior a quantidade de carga aniônica disponível. A presença de um excesso de carga negativa pode neutralizar as cargas positivas provenientes do quitosano, anulando o efeito de repulsão electrostática, o que culmina em agregação e, assim, formação de um precipitado (79).

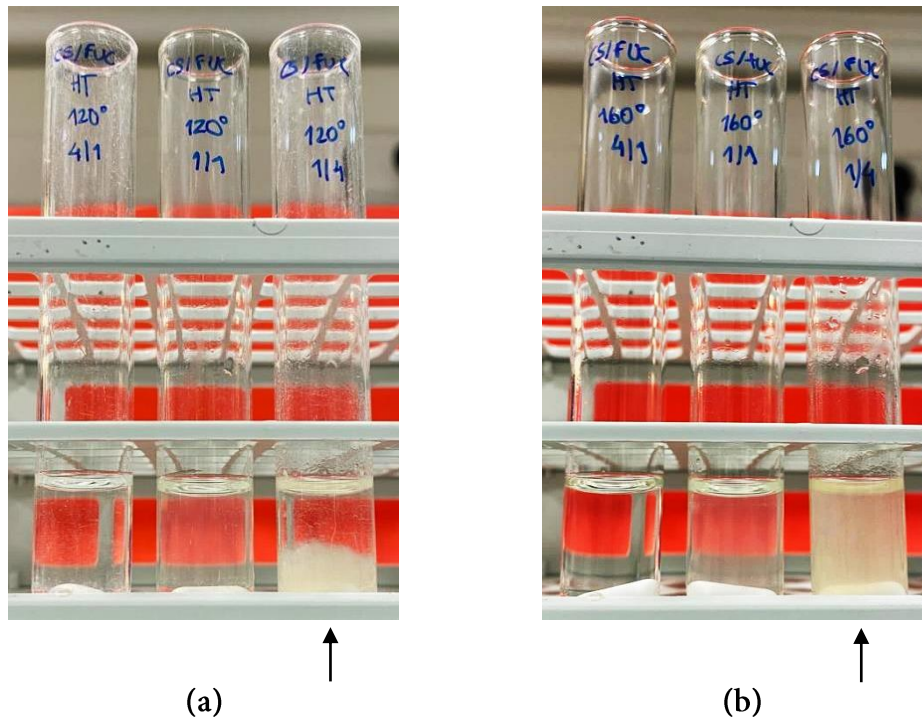


Figura 4.6 - Imagens representativas da formação de precipitado nas nanopartículas (a) CS/FUCe = 1/4 produzidas com extrato obtido a 120 °C e (b) CS/FUCe = 1/4 produzidas com extrato obtido a 160 °C. Os tubos relativos a cada caso estão indicados com uma seta.

As Figuras 4.7 e 4.8 representam, respetivamente, os resultados de tamanho e potencial zeta em média das amostras formuladas com extratos obtidos a diferentes temperaturas a partir da alga castanha *Himantalia elongata*.

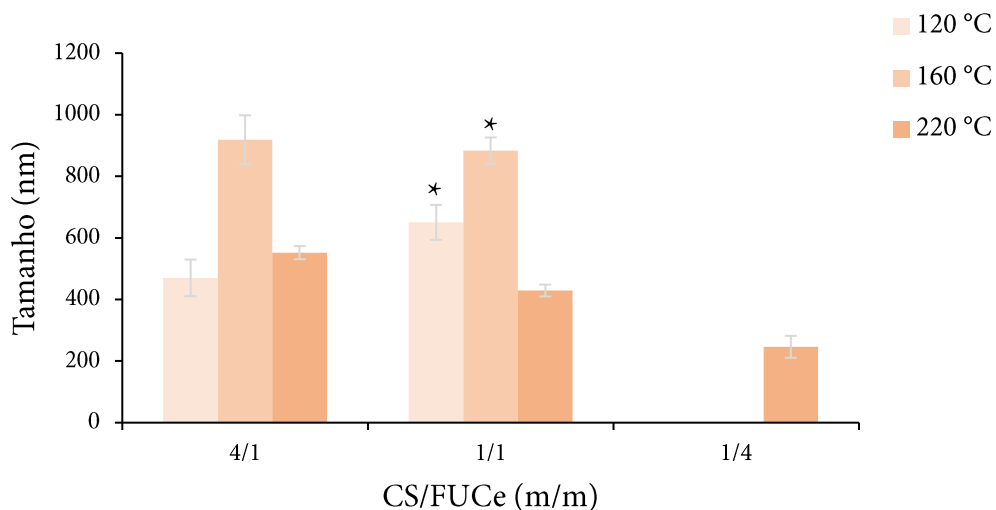


Figura 4.7 - Tamanho médio das nanopartículas CS/FUCe (4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga *Himantalia elongata* obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n \geq 3$). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.

A Figura 4.7 revela que, a exemplo do que se observou com os extratos de *Laminaria ochroleuca*, as nanopartículas CS/FUCe exibem tendencialmente menor tamanho à medida que aumenta na sua composição a quantidade de FUCe. Neste caso, o tamanho mais reduzido (246 nm; Pdl 0,402) foi registado para as nanopartículas CS/FUCe = 1/4 produzidas com extrato obtido a 220 °C. Nas nanopartículas produzidas com este extrato (220 °C) houve um decréscimo significativo do tamanho das nanopartículas à medida que se foi aumentando a concentração de FUCe ($p < 0.05$). Este decréscimo de tamanho pode estar relacionado com a presença duma quantidade constante de um polímero com cadeias poliméricas maiores (CS), a que se adiciona uma pequena quantidade de FUCe, pela mesma razão apresentada anteriormente nos resultados de *Laminaria ochroleuca*, podem formar-se alguns agregados maiores que não correspondem exatamente a uma formação contínua e homogénea de nanopartículas, o que justifica o aumento do tamanho nas razões de massa CS/FUCe = 4/1. Enquanto para as nanopartículas produzidas com o extrato obtido a 220 °C o decréscimo é sustentado, o facto de ter havido precipitação para as nanopartículas CS/FUCe = 1/4 produzidas com extratos obtidos a 120 °C e 160 °C impede conclusões mais abrangentes. Importa ainda referir que, para o extrato obtido a 160 °C, as partículas obtidas têm um tamanho já próximo de 1 μm , assim limitando por exemplo a capacidade de interação com as estruturas celulares que é proporcionada por veículos mais pequenos. O Pdl (Tabela 4.2) foi, com poucas exceções, mais baixo nas nanopartículas com maior quantidade de FUCe.

Tabela 4.2 – Índice de polidispersão (Pdl) das nanopartículas CS/FUCe formuladas com *Himanthalia elongata* (média \pm desvio padrão; $n \geq 3$). Estes dados encontram-se em anexo.

$T_{\text{extração}}$ FUCe (°C)	CS/FUCe (m/m)	Pdl
120	4/1	0,336 \pm 0,112
	1/1	0,381 \pm 0,110
160	4/1	0,513 \pm 0,165
	1/1	0,466 \pm 0,151
220	4/1	0,524 \pm 0,072
	1/1	0,419 \pm 0,063
	1/4	0,402 \pm 0,086

CS: quitosano; FUCe: extrato de fucoidano; $T_{\text{extração}}$ FUCe: Temperatura de extração de FUCe.

O potencial zeta das nanopartículas, mostrado na Figura 4.8, regista uma carga superficial positiva em todas as formulações produzidas, tal como se observou também para as nanopartículas produzidas com o extrato de *Laminaria ochroleuca*. De novo, esta observação demonstra a superioridade da densidade de carga do CS face ao FUCe. Pode ainda dizer-se que as nanopartículas CS/FUCe produzidas com extratos obtidos a 120 °C e 160 °C, assim como as CS/FUCe = 1/4 produzidas com o extrato obtido a 220 °C, exibem potencialmente maior estabilidade, uma vez que apresentam valores absolutos de potencial zeta superiores a +30 mV (90). Para os extratos obtidos a 120 °C e 160 °C, em que se produziram apenas nanopartículas CS/FUCe = 4/1 e 1/1, os valores de potencial zeta mantiveram-se aproximadamente iguais acima dos +60 mV. Já nas nanopartículas formuladas com extrato de alga a 220 °C, houve diferenças significativas entre as razões de massa 4/1, 1/1 e 1/4 ($p < 0,05$). Nessa progressão de razões de massa, em que o FUCe vai aumentando, era esperável uma diminuição do valor de potencial zeta mas, surpreendentemente, o observado foi o contrário, tal como verificado na outra alga analisada. Foi ainda visível uma grande diferença no valor do potencial zeta nas nanopartículas CS/FUCe = 4/1 e 1/1 formuladas com extrato obtido a 220 °C quando comparado com nanopartículas formuladas com extratos de 120 °C e 160 °C ($p < 0,05$).

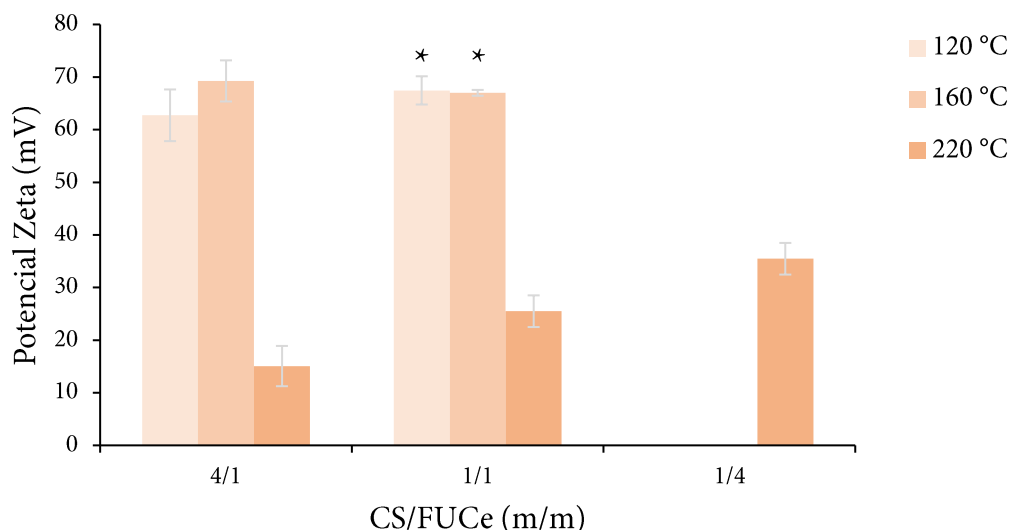


Figura 4.8 - Potencial zeta médio das nanopartículas CS/FUCe (4/1, 1/1, 1/4, m/m) formuladas com extratos da alga *Himanthalia elongata* obtidos a 120 °C, 160 °C e 220 °C. Os dados representam a média e o desvio padrão ($n \geq 3$). As nanopartículas que demonstraram ter efeito Tyndall foram assinaladas com *.

Ao analisar os dados publicados no que diz respeito ao FTIR de extratos obtidos da *Himanthalia elongata* (Figura 4.9) verifica-se que quanto menor é a temperatura de extração, mais marcada é a banda obtida a 1260 cm^{-1} que pode estar relacionada com a existência de grupos sulfato, ou seja, a quantidade de sulfatos presente nos extratos de *Himanthalia elongata* obtidos a $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ era menor do que nos extratos obtidos a temperatura de $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $160\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seria de esperar que à medida que se aumentasse a concentração de FUCe existisse uma diminuição dos valores de potencial zeta. Porém, durante a análise dos extratos verificou-se que há um aumento da quantidade de oligossacarídeos extraídos com o aumento da temperatura de extração da alga. Tal como foi reportado na secção anterior referente aos resultados de potencial zeta dos extratos obtidos de *Laminaria Ochroleuca*, a complexidade composicional dos extratos utilizados, com presença de outras substâncias para além do fucoidano, pode ter originado a camuflagem de parte das cargas negativas, criando um efeito de escudo, tornando-as indisponíveis para a interação com o CS. Assim, os extratos obtidos a $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $160\text{ }^{\circ}\text{C}$, apesar de apresentarem uma quantidade maior de sulfatos, poderão não ter estes grupos totalmente disponíveis para interação com os grupos amina do CS (61).

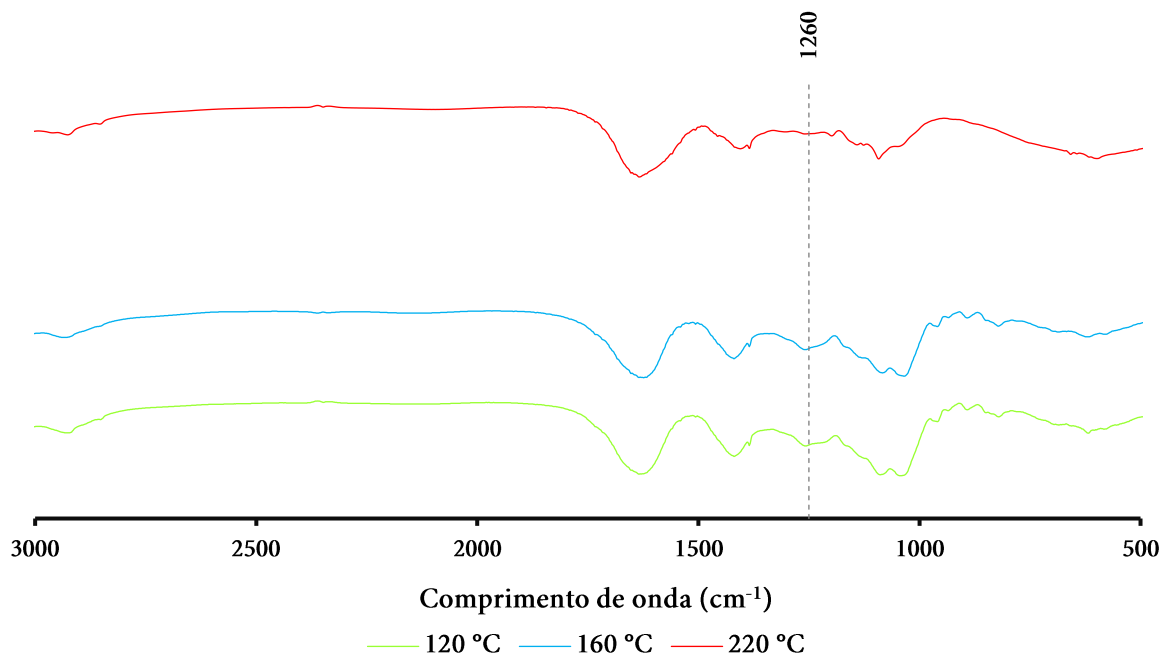


Figura 4.9 - Espectro FTIR de extratos bioativos obtidos por auto hidrólise de extratos líquidos de *Himanthalia elongata* a diferentes temperaturas de extração. Adaptado de (61).

As nanopartículas foram igualmente caracterizadas quanto ao rendimento de produção, o qual, para esta alga *Himanthalia elongata*, foi calculado apenas para as nanopartículas CS/FUCe = 1/1 formuladas com extrato obtido a 120 °C e 160 °C, que apresentaram efeito Tyndall. Os valores de rendimento de produção estão detalhados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 –Rendimento de produção das nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos da alga *Himanthalia elongata* obtidos a diferentes temperaturas. Os resultados representam a média e o desvio padrão (n=3).

Fonte FUCe	Extração (°C)	CS/FUCe (m/m)	Rendimento (%)
<i>Himanthalia elongata</i>	120	1/1	24,0 ± 4,0
	160	1/1	33,3 ± 6,1

Os rendimentos de produção das formulações com FUCe de *Himanthalia elongata* CS/FUCe = 1/1 preparadas com extratos obtidos a 120 °C e 160 °C, apresentaram valores de rendimento mais elevados quando comparados com os valores de rendimento de *Laminaria ochroleuca*. Este resultado seria expectável uma vez que as nanopartículas formuladas com FUCe de *Himanthalia elongata* demonstraram ter um efeito Tyndall mais intenso.

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Neste trabalho, com a finalidade de utilizar compostos de origem marinha para a produção de nanopartículas com potencial interesse terapêutico, verificou-se que o método de complexação polieletrólítica foi adequado para produzir nanopartículas a partir dos polímeros de origem marinha selecionados, CS e FUCe. Em algumas condições testadas, foi possível preparar sistemas nanoparticulados com características de tamanho e potencial zeta consideradas adequadas para utilização na área farmacêutica.

A utilização de algas de origem diferente para preparação dos extratos não se traduziu em diferenças significativas nas nanopartículas preparadas. As nanopartículas produzidas com maior teor de FUCe, exibiram tamanhos mais reduzidos (entre 240-400 nm) e dispersões de tamanho mais uniformes (entre 0,28 e 0,4), possivelmente devido ao aumento de cadeias fucose-grupos sulfato disponíveis e, por isso, maior disponibilidade de grupos capazes de estabelecer interação com o CS. Por outro lado, o potencial zeta revelou valores inesperados uma vez que foi detetada uma tendência de aumento da carga superficial das nanopartículas com o aumento do teor de FUCe nas preparações, o que diverge das expectativas uma vez que este composto contém na sua constituição grupos sulfato carregados negativamente. Sugere-se que uma indisponibilidade desses grupos para interação, por algum efeito do tipo escudo, não obstante a sua presença, possa ser uma possível explicação para os resultados observados.

A observação do efeito Tyndall e consequente cálculo dos rendimentos de produção das nanopartículas que exibiram esse efeito, permitiu concluir que os extratos de *Himanthalia elongata* apresentam maior capacidade de produção das nanopartículas, exibindo rendimentos de produção superiores, da ordem dos 24-33%, em comparação com os cerca de 4% quantificados para as nanopartículas preparadas com extratos de *Laminaria ochroleuca*.

De modo geral, os extratos de algas parecem ter algum potencial para a produção de nanopartículas, não obstante a necessidade de realizar mais estudos para permitir conclusões mais objetivas. Estudar a capacidade de encapsulação de uma molécula de interesse, bem como a estabilidade e o comportamento a nível de toxicidade, são exemplos de próximos passos a seguir na avaliação dos sistemas.

6. Referências

1. World Health Organization: The top 10 causes of death. WHO's Global Health Estimates. 2020 [citado Outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
2. Díaz LD, Fernández-ruiz V, Cámara M. The frontier between nutrition and pharma: The international regulatory framework of functional foods, food supplements and nutraceuticals. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60:1738–46.
3. Resende V, Grenha A. A tecnologia na saúde: evolução e expectativas para o futuro. Tese de Mestrado; Universidade do Algarve; 2017.
4. Patel L, Shukla T, Huang X, Ussery DW, Wang S. Machine learning methods in drug discovery. *Molecules.* 2020;25:1–17.
5. Crommelin DJA. Formulation of biotech products, including biopharmaceutical considerations. Em: *Pharmaceutical Biotechnology: Fundamentals and applications.* 4.^a ed. Springer. Cap. 4; 2013. 67–94.
6. Rifaioglu AS, Atas H, Martin MJ, Cetin-Atalay R, Atalay V, Do T. Recent applications of deep learning and machine intelligence on in silico drug discovery: methods, tools and databases. *Brief Bioinform.* 2019;20:1878–912.
7. Stryjewska A, Kiepusa K, Librowski T, Lochyński S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacol Reports.* 2013;65(5):1075–85.
8. Zahin N, Anwar R, Tewari D, Tanvir Kabir M, Sajid A, Mathew B, et al. Nanoparticles and its biomedical applications in health and diseases: special focus on drug delivery. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27:19151–68.
9. Kee JL, Hayes ER, McCuiston LE. Drug Action: Pharmaceutic, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Phases. Em: *Pharmacology: a patient-centered nursing process approach.* 10.^a ed. Cap. 1; 2020. 1–13.
10. 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(112):1–15.

11. Size-comparison-Bio-nanoparticles nanometer scale comparison nanoparticle size comparison nanotechnology chart ruler. WICHLab. [citado Outubro de 2021]. Disponível em: <https://www.wichlab.com/nanometer-scale-comparison-nanoparticle-size-comparison-nanotechnology-chart-ruler-2/>
12. Contera S, Serna JB de la, Tetley TD. Biotechnology, nanotechnology and medicine. *Emerg Top Life Sci.* 2021;4:551–4.
13. Marques I, Lopes CM, Souto E. Novos sistemas terapêuticos nanotecnológicos. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde.* 2009;6:60–8.
14. Naahidi S, Jafari M, Edalat F, Raymond K, Khademhosseini A, Chen P. Biocompatibility of engineered nanoparticles for drug delivery. *J Control Release.* 2013;166(2):182–94.
15. Citkowska A, Szekalska M, Winnicka K. Possibilities of fucoidan utilization in the development of pharmaceutical dosage forms. *Mar Drugs.* 2019;17:1–20.
16. Chen XJ, Zhang XQ, Liu Q, Zhang J, Zhou G. Nanotechnology: a promising method for oral cancer detection and diagnosis. *J Nanobiotechnol.* 2018;16:1–17.
17. Mei L, Zhang Z, Zhao L, Huang L, Yang X, Tang J, et al. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:880–90.
18. Lollo G, Gonzalez-Paredes A, Garcia-Fuentes M, Calvo P, Torres D, Alonso MJ. Polyarginine nanocapsules as a potential oral peptide delivery carrier. *J Pharm Sci.* 2017;106:611–8.
19. Ajorlou E, Khosroushahi AY. Trends on polymer - and lipid-based nanostructures for parenteral drug delivery to tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2017;79:251–65.
20. Khademi F, Derakhshan M, Yousefi-Avarvand A, Tafaghodi M. Potential of polymeric particles as future vaccine delivery systems/adjuvants for parenteral and non-parenteral immunization against tuberculosis: A systematic review. *Iran J Basic Med Sci.* 2018;21:116–23.
21. Shetab Boushehri MA, Dietrich D, Lamprecht A. Nanotechnology as a platform for the development of injectable parenteral formulations: A comprehensive review of the know-hows and state of the art. *Pharmaceutics.* 2020;12:1–53.

22. Bahman F, Greish K, Taurin S. Nanotechnology in insulin delivery for management of diabetes. *Pharm Nanotechnol.* 2019;7(2):113–28.
23. Kumar A, Pandey AN, Jain SK. Nasal-nanotechnology: revolution for efficient therapeutics delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(3):671–83.
24. Grenha A, Alves AD, Guerreiro F, Pinho J, Simões S, José A, et al. Inhalable locust bean gum microparticles co-associating isoniazid and rifabutin : Therapeutic assessment in a murine model of tuberculosis infection. *Eur J Pharm Biopharm.* 2020;147:38–44.
25. Passi M, Shahid S, Chockalingam S, Sundar IK, Packirisamy G. Conventional and nanotechnology based approaches to combat chronic obstructive pulmonary disease: Implications for chronic airway diseases. *Int J Nanomedicine.* 2020;15:3803–26.
26. Andrade F, Rafael D, Videira M, Ferreira D, Sosnik A, Sarmento B. Nanotechnology and pulmonary delivery to overcome resistance in infectious diseases. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:1816–27.
27. Jiang S, Franco YL, Zhou Y, Chen J. Nanotechnology in retinal drug delivery. *Int J Ophthalmol.* 2018;11:1038–44.
28. Gote V, Sikder S, Sicotte J, Pal D. Ocular drug delivery: Present innovations and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther.* 2019;370:602–24.
29. das Neves J, Nunes R, Machado A, Sarmento B. Polymer-based nanocarriers for vaginal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;92:53–70.
30. Mesquita L, Galante J, Nunes R, Sarmento B, Neves J Das. Pharmaceutical vehicles for vaginal and rectal administration of anti-hivmicrobicide nanosystems. *Pharmaceutics.* 2019;11(3):1–20.
31. Iqbal Z, Dilnawaz F. Nanocarriers for vaginal drug delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul.* 2019;13(1):3–15.
32. Oliveira C, Neves NM, Reis RL, Martins A, Silva TH. A review on fucoidan antitumor strategies: From a biological active agent to a structural component of fucoidan-based systems. *Carbohydr Polym.* 2020;239:1–9.
33. Oliveira C, Neves NM, Reis RL, Martins A, Silva TH. Gemcitabine delivered by fucoidan/chitosan nanoparticles presents increased toxicity over human breast cancer cells. *Nanomedicine.* 2018;13(8):1671–95.

34. Zhang Y, Li M, Gao X, Chen Y. Nanotechnology in cancer diagnosis: progress, challenges and opportunities. *J Hematol Oncol.* 2019;12:1–13.
35. Chaturvedi VK, Singh A, Singh VK, Singh MP. Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Curr Drug Metab.* 2019;20:416–29.
36. Win KY, Feng SS. *In vitro* and *in vivo* studies on vitamin E TPGS-emulsified poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation. *Biomaterials.* 2006;27:2285–91.
37. Ma P, Mumper RJ. Paclitaxel nano-delivery systems: A comprehensive review. *Natl institutes Heal.* 2013;4(2):1–35.
38. Al-jaouni S, Abdul-hady S, El-bassossy H, Salah N, Hagraas M. Nanopreparation prevents doxorubicin-associated cardiac dysfunction: effect on cardiac ischemia and antioxidant capacity. *Integr Cancer Ther.* 2019;18:1–9.
39. Pelgriff RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65:1803–15.
40. Aruguete DM, Kim B, Hochella MF, Ma Y, Cheng Y, Hoegh A, et al. Antimicrobial nanotechnology: its potential for the effective management of microbial drug resistance and implications for research needs in microbial nanotoxicology. *Environ Sci Pollut Res.* 2013;15:93–102.
41. Munir, Muhammad Usman Ahmed A, Usman M, Salman S. Recent advances in nanotechnology-aided materials in combating microbial resistance and functioning antibiotics substitutes. *Int J Nanomedicine.* 2021;15:7329–58.
42. Gaspar DP, Gaspar MM, Eleute C V, Grenha A, Blanco M, Taboada P, et al. Microencapsulated solid lipid nanoparticles as a hybrid platform for pulmonary antibiotic delivery. *Mol Pharm.* 2017;14:2977–90.
43. Kerry RG, Gouda S, Sil B, Das G, Shin H, Ghodake G, et al. Cure of tuberculosis using nanotechnology: An overview. *J Microbiol.* 2018;56:287–99.
44. Nasiruddin M, Neyaz K, Das S. Nanotechnology-based approach in tuberculosis treatment. *Tuberc Res Treat.* 2017;2017:1–12.
45. Patel BK, Parikh RH, Aboti PS. Development of oral sustained release rifampicin loaded chitosan nanoparticles by design of experiment. *J Drug Deliv.* 2013;2013:1–10.

46. Johnson CM, Pandey R, Sharma S, Khuller GK, Basaraba RJ, Orme IM, et al. Oral therapy using nanoparticle-encapsulated antituberculosis drugs in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4335–8.
47. Sharma A, Sharma S, Khuller GK. Lectin-functionalized poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles as oral/aerosolized antitubercular drug carriers for treatment of tuberculosis. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(4):761–6.
48. Obinu A, Porcu EP, Piras S, Ibba R, Carta A, Molicotti P, et al. Solid lipid nanoparticles as formulative strategy to increase oral permeation of a molecule active in multidrug-resistant tuberculosis management. *Pharmaceutics*. 2020;12:1–24.
49. Costa-Gouveia J, Pancani E, Jouny S, Machelart A, Delorme V, Salzano G, et al. Combination therapy for tuberculosis treatment: Pulmonary administration of ethionamide and booster co-loaded nanoparticles. *Sci Rep Nature Publishing Group*. 2017;7:1–14.
50. Debnath SK, Saisivam S, Debnath M, Omri A. Development and evaluation of Chitosan nanoparticles based dry powder inhalation formulations of Prothionamide. *PLoS One*. 2018;13:1–12.
51. Fawaz F, Bonini F, Maugein J, Lagueny AM. Ciprofloxacin-loaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: pharmacokinetics and *in vitro* antimicrobial activity. *Int J Pharm*. 1998;168:255–9.
52. Khademi F, Yousefi A, Derakhshan M, Najafi A, Tafaghodi M. Enhancing immunogenicity of novel multistage subunit vaccine of *Mycobacterium tuberculosis* using PLGA:DDA hybrid nanoparticles and MPLA: Subcutaneous administration. *Iran J Basic Med Sci*. 2019;22:893–900.
53. Pandey R, Khuller GK. Subcutaneous nanoparticle-based antitubercular chemotherapy in an experimental model. *J Antimicrob Chemother*. 2004;54:266–8.
54. Yaqoob AA, Ahmad H, Parveen T, Ahmad A, Oves M, Ismail IMI, et al. Recent advances in metal decorated nanomaterials and their various biological applications: A Review. *Front Chem*. 2020;8:1–23.
55. Ahlawat J, Henriquez G, Narayan M. Enhancing the delivery of chemotherapeutics: role of biodegradable polymeric nanoparticles. *Molecules*. 2018;23:1–20.

56. Braz L, Dionísio M, Grenha A. Chitosan-based Nanocarriers: Effective Vehicles for mucosal Protein Delivery. Em: Chitosan-based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. 2011;365–412.
57. Soppimath KS, Aminabhavi TM, Kulkarni AR. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. J Control Release. 2001;70:1–20.
58. Li B, Lu F, Wei X, Zhao R. Fucoidan: Structure and bioactivity. Molecules. 2008;13:1671–95.
59. Pereira L. MACOI - Portuguese seaweeds website. World-wide Electronic Publication. IMAR, Department of Life Sciences, University of Coimbra. Disponível em: <http://macoi.ci.uc.pt/>
60. Pereira TR, Azevedo IC, Oliveira P, Silva DM, Sousa-pinto I. Life history traits of *Laminaria ochroleuca* in Portugal: The range-center of its geographical distribution. Aquat Bot. 2019;152:1–9.
61. Cernadas H, Flórez-Fernández N, González-Muñoz MJ, Domínguez H, Torres MD. Retrieving of high-value biomolecules from edible *Himanthalia elongata* brown seaweed using hydrothermal processing. Food Bioprod Process. 2019;117:275–86.
62. Flórez-Fernández N, Torres MD, González-Muñoz MJ, Domínguez H. Recovery of bioactive and gelling extracts from edible brown seaweed *Laminaria ochroleuca* by non-isothermal autohydrolysis. Food Chem. 2019;277:353–61.
63. Ganesan AR, Tiwari U, Rajauria G. Seaweed nutraceuticals and their therapeutic role in disease prevention. Food Sci Hum Wellness. 2019;8:252–63.
64. Flórez-Fernández N, Álvarez-Vinãs M, Guerreiro F, Torres MD, Grenha A, Domínguez H. Hydrothermal processing of *Laminaria ochroleuca* for the production of crude extracts used to formulate polymeric nanoparticles. Mar Drugs. 2020;18:1–17.
65. Torres MD, Flórez-Fernández N, Simón-Vázquez R, Giménez-Abian JF, Díaz JF, González-Fernández Á, Domínguez H. Fucoidans: The importance of processing on their anti-tumoral properties. Algal Res. 2020;45:1–21.
66. Cunha L, Grenha A. Sulfated seaweed polysaccharides as multifunctional materials in drug delivery applications. Mar Drugs. 2016;14:1–41.

67. Zayed A, El-Aasr M, Ibrahim ARS, Ulber R. Fucoïdan characterization: Determination of purity and physicochemical and chemical properties. *Mar Drugs*. 2020;18(11):1–31.
68. Deniaud-Bouët E, Kervarec N, Michel G, Tonon T, Kloareg B, Hervé C. Chemical and enzymatic fractionation of cell walls from Fucales: Insights into the structure of the extracellular matrix of brown algae. *Ann Bot*. 2014;114:1203–16.
69. Ale MT, Mikkelsen JD, Meyer AS. Important determinants for fucoïdan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Mar Drugs*. 2011;9:2106–30.
70. Vaamonde-García C, Flórez-Fernández N, Torres MD, Lamas-Vázquez MJ, Blanco FJ, Domínguez H, et al. Study of fucoïdans as natural biomolecules for therapeutical applications in osteoarthritis. *Carbohydr Polym*. 2021;258:1–11.
71. Rizeq BR, Younes NN, Rasool K, Nasrallah GK. Synthesis, bioapplications, and toxicity evaluation of chitosan-based nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019;20:1–24.
72. Garg U, Chauhan S, Nagaich U, Jain N. Current advances in chitosan nanoparticles based drug delivery and targeting. *Adv Pharm Bull*. 2019;9(2):195–204.
73. Muthu M, Gopal J, Chun S, Jacintha A, Devadoss P, Hasan N, et al. Crustacean waste-derived chitosan: antioxidant properties and future perspective. *Antioxidants*. 2021;10:1–27.
74. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 2015;13:1133–74.
75. Huang YC, Li RY. Preparation and characterization of antioxidant nanoparticles composed of chitosan and fucoïdan for antibiotics delivery. *Mar Drugs*. 2014;12(8):4379–98.
76. Lang X, Wang T, Sun M, Chen X, Liu Y. Advances and applications of chitosan-based nanomaterials as oral delivery carriers: A review. *Int J Biol Macromol*. 2020;154:433–45.
77. Del Prado-Audelo ML, Caballero-Florán IH, Sharifi-Rad J, Mendoza-Muñoz N, González-Torres M, Urbán-Morlán Z, et al. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2020;59:1–17.

78. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62:3–11.
79. Rodrigues S, Costa AMR Da, Grenha A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydr Polym.* 2012;89:282–9.
80. Hembram KC, Prabha S, Chandra R, Ahmed B, Nimesh S. Advances in preparation and characterization of chitosan nanoparticles for therapeutics. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* 2014;44:305–14.
81. Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2014;64:353–67.
82. Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discov Today.* 2017;22:1697–706.
83. Quiñones JP, Peniche H, Peniche C. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. *Polymers.* 2018;10:1–32.
84. Grenha A. Chitosan nanoparticles: A survey of preparation methods. *J Drug Target.* 2012;20(4):291–300.
85. González-López N, Moure A, Domínguez H. Hydrothermal fractionation of *Sargassum muticum* biomass. *J Appl Phycol.* 2012;24(6):1569–78.
86. Hoshyar N, Gray S, Han H, Bao G. The effect of nanoparticle size on *in vivo* pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine.* 2016;11:673–92.
87. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Davarani FH, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics.* 2018;10:1–17.
88. Li Q, Xie Y, Xu G, Lebrilla CB. Identification of potential sialic acid binding proteins on cell membranes by proximity chemical labeling. *Chem Sci.* 2019;10:6199–209.
89. Honary S, Zahir F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (part 1). *Trop J Pharm Res.* 2013;12:255–64.

90. González-Ballesteros N, Flórez-Fernández N, Torres MD, Domínguez H, Rodríguez-Argüelles MC. Synthesis, process optimization and characterization of gold nanoparticles using crude fucoidan from the invasive brown seaweed *Sargassum muticum*. *Algal Res.* 2021;58:1–12.
91. Xiao W, Deng Z, Huang J, Huang Z, Zhuang M, Yuan Y, et al. Highly sensitive colorimetric detection of a variety of analytes via the tyndall effect. *Anal Chem.* 2019;91:15114–22.

7. Anexos

7.1 Desenho experimental das nanopartículas CS/FUCe

Tabela 7.1 – Volumes e concentrações de todos os componentes utilizados na preparação das nanopartículas CS/FUCe.

CS/FUCe	[CS] (mg/mL)	[FUCe] (mg/mL)	V _{CS} (mL)	V _{FUCe} (mL)	V _{Total} (mL)
4/1	1	0,625	2	0.8	2.8
1/1	1	2,5	2	0.8	2.8
1/4	1	10	2	0.8	2.8

7.2 Resultados obtidos

Tabela 7.2 – Valores de tamanho (nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (mV) obtidos nas nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos obtidos de *Laminaria ochroleuca*.

CS/FUCe										
		120 °C			160 °C			220 °C		
n	Razão (m/m)	Tamanho (nm)	Pdl	P. Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Pdl	P. Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Pdl	P. Zeta (mV)
1	4/1	739.0	0.569	+23.8	690.1	0.520	+21.9	716.8	0.672	+21.6
	1/1	621.9	0.429	+20.0	334.3	0.380	+48.8	578.4	0.480	+18.1
	1/4	500.7	0.254	+40.1	486.8	0.278	+57.8	406.2	0.650	+17.2
2	4/1	851.4	0.609	+28.5	576.6	0.523	+26.6	625.2	0.559	+19.6
	1/1	626.1	0.262	+20.0	322.4	0.412	+55.9	501.3	0.601	+13.2
	1/4	473.8	0.215	+40.9	513.6	0.284	+58.3	410.2	0.543	+23.2
3	4/1	736.1	0.610	+23.8	561.1	0.456	+22.5	716.2	0.718	+19.6
	1/1	602.7	0.586	+21.8	408.7	0.354	+55.1	585.9	0.483	+18.2
	1/4	505.4	0.360	+44.3	421.8	0.288	+59.6	483.6	0.445	+17.0
4	4/1	-	-	-	566.6	0.470	+27.2	-	-	-
	1/1	-	-	-	345.4	0.396	+42.2	-	-	-
	1/4	-	-	-	456.7	0.324	+60.9	-	-	-
5	4/1	-	-	-	586.0	0.460	+24.5	-	-	-
	1/1	-	-	-	438.5	0.343	+45.1	-	-	-
	1/4	-	-	-	481.4	0.294	+62.3	-	-	-
6	4/1	-	-	-	612.3	-	-	-	-	-
	1/1	-	-	-	382.2	0.409	+45.2	-	-	-
	1/4	-	-	-	448.3	0.287	+62.4	-	-	-
7	4/1	-	-	-	542.9	-	-	-	-	-
	1/1	-	-	-	445.1	0.173	+44.9	-	-	-
	1/4	-	-	-	473.3	0.273	+61.6	-	-	-
8	1/1	-	-	-	444.3	0.377	+57.4	-	-	-
	1/4	-	-	-	479.5	0.254	+61.6	-	-	-
9	1/1	-	-	-	498.4	0.669	+60.0	-	-	-

Tabela 7.3 – Resultados obtidos do rendimento de produção em nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos da alga *Laminaria ochroleuca* a diferentes temperaturas. Os resultados representam a média e o desvio padrão.

Amostras	T _{extração} (°C)	Razão CS/FUCe (m/m)	Massa NP (mg)	Rendimento (%)	Média ± Desvio Padrão (%)
1	160	1/4	0,4	4,00	4,33 ± 1,53
2	160	1/4	0,6	6,00	
3	160	1/4	0,3	3,00	

Formulação de nanopartículas poliméricas a partir de extratos
das algas marinhas comestíveis *Laminaria ochroleuca* e *Himanthalia elongata*

Tabela 7.4 – Valores de tamanho (nm), índice de polidispersão (Pdl) e potencial zeta (mV) obtidos nas nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos obtidos de *Himanthalia elongata*.

CS/FUCe										
		120 °C			160 °C			220 °C		
n	Razão (m/m)	Tamanho (nm)	Pdl	P. Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Pdl	P. Zeta (mV)	Tamanho (nm)	Pdl	P. Zeta (mV)
1	4/1	616.6	0.405	+68.3	832.8	0.468	+68.2	654.7	0.492	+11.0
	1/1	789.0	0.426	+66.5	923.9	0.573	+67.6	407.2	0.347	+24.8
	1/4	-	-	-	-	-	-	205.7	0.387	+33.3
2	4/1	537.3	0.456	+61.3	932.0	0.696	+73.6	529.4	0.473	+15.6
	1/1	662.9	0.393	+70.5	838.0	0.308	+66.9	442.9	0.451	+28.8
	1/4	-	-	-	-	-	-	262.1	0.325	+38.9
3	4/1	448.6	0.250	+58.7	623.2	0.376	+66.0	530.8	0.606	+18.6
	1/1	699.7	0.480	+65.4	915.8	0.615	+66.5	437.3	0.460	+22.9
	1/4	-	-	-	-	-	-	271.4	0.495	+34.2
4	4/1	424.2	0.231	-	990.5	-	-	493.1	-	-
	1/1	588.4	0.225	-	854.8	0.367	-	-	-	-

Tabela 7.5 – Resultados obtidos do rendimento de produção em nanopartículas CS/FUCe formuladas com extratos da alga *Himanthalia elongata* a diferentes temperaturas. Os resultados representam a média e o desvio padrão.

Amostras	T _{extração} (°C)	Razão CS/FUCe (m/m)	Massa NP (mg)	Rendimento (%)	Média ± Desvio Padrão (%)
1	160	1/1	1	40,00	33,33 ± 6,11
2	160	1/1	0,7	28,00	
3	160	1/1	0,8	32,00	
4	120	1/1	0,6	24,00	24,00 ± 4,00
5	120	1/1	0,5	20,00	
6	120	1/1	0,7	28,00	

