

E.3.2.4. Síntese, caracterização e biocompatibilidade de biomateriais e nanopartículas

Alternativa integral para la explotación de macroalgas en la zona del Galicia y Portugal

ALGALUP

0558_ALGALUP_6_E

Junho de 2022



Índice

1. Introdução	6
1.1. Algalup	6
1.2. Espécies seleccionadas.....	6
2. Extração dos polissacáridos a partir das algas	7
3. Análise das propriedades físico-químicas e biológicas dos polissacáridos: estudo comparativo entre galiza e portugal e estações do ano.....	8
3.1. Caracterização físico-química dos polissacarídeos	8
3.1.1. Análise de ftir	8
3.1.2. Análise por espectroscopia de uv	8
3.1.3. Determinação da carga superficial	9
3.1.4. Percentagem de grupos sulfato.....	10
3.1.5. Peso molecular	11
3.1.6. Composição de açúcares	12
3.2. Caracterização das propriedades biológicas dos polissacarídeos.....	14
3.2.1. Atividade antioxidante	14
3.2.2. Biocompatibilidade	16
3.2.3. Migração celular.....	17
4. Produção de nanopartículas pelo polissacarídeo de <i>osmundea</i> sp.	18
4.1. Caracterização das propriedades morfológicas das nanopartículas	19
4.2. Avaliação da estabilidade das nanopartículas	20
4.3. Caracterização do perfil de libertação do diclofenac a partir das nanopartículas ..	21
4.4. Avaliação da biocompatibilidade das nanopartículas	22
5. Produção de nanopartículas metálicas mediadas pela biomassa de <i>codium</i> sp.	24
5.1. Caracterização das nanopartículas de prata.....	25
6. Produção de esponjas com o polissacarídeo de <i>codium</i> sp. Incorporadas com as nanopartículas de prata	28
6.1. Caracterização físico-química das esponjas	28
6.2. Avaliação da biocompatibilidade das esponjas	31
7. Conclusões.....	31

Índice de Figuras



Figura 1. Representação ilustrativa do processo de extração dos polissacáridos a partir as amostras de algas secas de <i>Codium sp.</i> e <i>Osmundea sp.</i>	7
Figura 2. Espectro de FTIR dos polissacáridos extraídos de <i>Codium sp.</i> e <i>Osmundea sp.</i>	8
Figura 3. Espectro de UV dos polissacáridos extraídos a partir de amostras de <i>Codium</i> and <i>Osmundea</i>	9
Figura 4. Determinação da carga superficial dos polissacáridos extraídos a partir de amostras de <i>Codium sp</i> and <i>Osmundea sp.</i>	10
Figura 5. Quantificação da concentração de grupos sulfato dos polissacáridos extraídos a partir de amostras de <i>Codium sp</i> and <i>Osmundea sp.</i>	11
Figura 6. Cromatografia de permeação em gel de <i>Osmundea_GZ</i> e <i>Osmundea_PT</i> , usando água como eluente.	12
Figura 7. Cromatografia de permeação em gel de <i>Codium_GZ</i> e <i>Codium_PT</i> , usando a água como eluente.	12
Figura 8. Determinação da atividade antioxidante, através do ensaio de DPPH, dos polissacáridos extraídos de <i>Osmundea sp.</i>	15
Figura 9. Determinação da atividade antioxidante, através do ensaio de DPPH, dos polissacáridos extraídos de <i>Codium sp.</i>	16
Figura 10. Caracterização da viabilidade celular dos fibroblastos em contato com os polissacáridos extraídos de <i>Codium sp.</i> e <i>Osmundea sp.</i> recolhidos na costa da Galiza e de Portugal no verão.	17
Figura 11. Efeito dos polissacáridos das algas na migração celular. Migração dos fibroblastos na presença de 2mg/mL de polissacáridos derivados de <i>Osmundea sp.</i> e <i>Codium sp.</i>	18
Figura 12. Avaliação das propriedades morfológicas das nanopartículas de CS_PS.	20
Figura 13. Determinação do tamanho das nanopartículas após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4°C (A) e 25°C (B).	21
Figura 14. Caracterização do perfil de libertação do diclofenac a partir das nanopartículas a pH 5 (pH da pele nativa) e a pH 8 (pele lesada).	22
Figura 15. Representação ilustrativa da metodologia associada ao ensaio de MTT para caracterizar o perfil citotóxico das nanopartículas de PS_CS (B) a diferentes concentrações (2 mg/mL- 0.05 mg/mL) em contacto com fibroblastos humanos durante 24h, 48h e 72h.	23
Figura 16. Representação ilustrativa da metodologia associada ao ensaio de MTT para caracterizar o perfil citotóxico das nanopartículas de PS_CS (B) a diferentes concentrações (2 mg/mL- 0.05 mg/mL) em contacto com queratinócitos humanos durante 24h, 48h e 72h.	24
Figura 17. Representação ilustrativa da metodologia usada para a produção de nanopartículas metálicas.....	25
Figura 18. Espectro UV da solução de nanopartículas de prata a diferentes tempos de reação.	25
Figura 19. Determinação do tamanho e carga superficial das nanopartículas de prata ao longo de vários tempos.	26
Figura 20. Determinação da viabilidade celular das nanopartículas de prata através do ensaio de MTT.	27
Figura 21. Representação ilustrativa da produção de esponjas incorporadas com nanopartículas de prata.....	28

Figura 22. Determinação da porosidade total das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.....	29
Figura 23. Caracterização do perfil de swelling das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.....	30
Figura 24. Caracterização do perfil de degradação das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.....	31
Figura 25. Determinação da biocompatibilidade das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.....	32
Figura 26. Atividade antibacteriana das esponjas em contacto com a S.aureus.....	33

Índice de Tabelas

Tabela 1. Composição de açúcares das polissacáridos de Osmundea e Codium extraídos da costa de Portugal e Galiza. 13

Tabela 2. Determinação dos valores MIC das nanopartículas de prata para diferentes estirpes bacterianas..... 27

1. Introdução

1.1. ALGALUP

Alternativa abrangente para a exploração de macroalgas na área da Galiza e Portugal (ALGALUP) é um projeto transfronteiriço que apoia o Crescimento Inteligente através da cooperação transfronteiriça para promover a inovação no setor das macroalgas. O projeto ALGALUP pretende desenvolver uma abordagem integrada de promoção da investigação e inovação no sector da exploração de macroalgas na Galiza e em Portugal, fomentando a interligação entre centros tecnológicos e instituições de ensino superior especializadas no sector de forma a melhorar o conhecimento sobre as espécies de interesse e a adaptabilidade das mesmas. Os processos de produção às condições específicas da área. Além disso, o projeto procura promover novas iniciativas para o uso da biomassa e avaliar a aplicação de derivados e compostos bioativos extraídos de algas em setores de interesse estratégico, tais como a área da biomedicina e da cosmética.

O objetivo final do projeto é:

- 1) aumentar o conhecimento dos usuários finais, pesquisadores e investidores sobre as oportunidades geradas pelo setor de exploração de macroalgas;
- 2) implementar um sistema de exploração sustentável dos bancos naturais de macroalgas e promover pesquisas nas diferentes etapas de cultivo das espécies de interesse;
- 3) Desenvolver novas alternativas de utilização de compostos, extratos e bioativos contidos nas macroalgas;
- 4) Estimular a transferência dos resultados obtidos para o tecido industrial dos setores de interesse.

Na atividade A3.2.4. foram sintetizados biomateriais e nanosistemas, aos quais foram caracterizadas as propriedades físico-químicas e biológicas.

1.2. ESPÉCIES SELECIONADAS

Durante a realização das atividades propostas no âmbito do projeto, foram selecionadas espécies de *Osmundea* sp e *Codium* sp, cujas amostras foram colhidas na costa da Galiza e Portugal, em diferentes pontos e estações do ano, e foram caracterizadas a nível físico-químico e biológico.

2. Extração dos polissacáridos a partir das algas

Após a receção das amostras de *Codium* sp. e *Osmundea* sp., foi otimizada a metodologia para extração de polissacáridos.

Assim, a extração dos polissacáridos realizou-se recorrendo à autoclave e minimizando o uso de solventes orgânicos, em que pela ação combinada de temperatura e pressão se induziu a rutura da integridade celular. Assim, após o processo de autoclave (variando de 1 a ciclos), procede-se à precipitação do polissacarídeo com etanol. No final deste processo obtiveram-se as amostras de polissacáridos que foram posteriormente caracterizados. Todo o processo adotado para a extração dos polissacáridos encontra-se ilustrado na Figura 1.

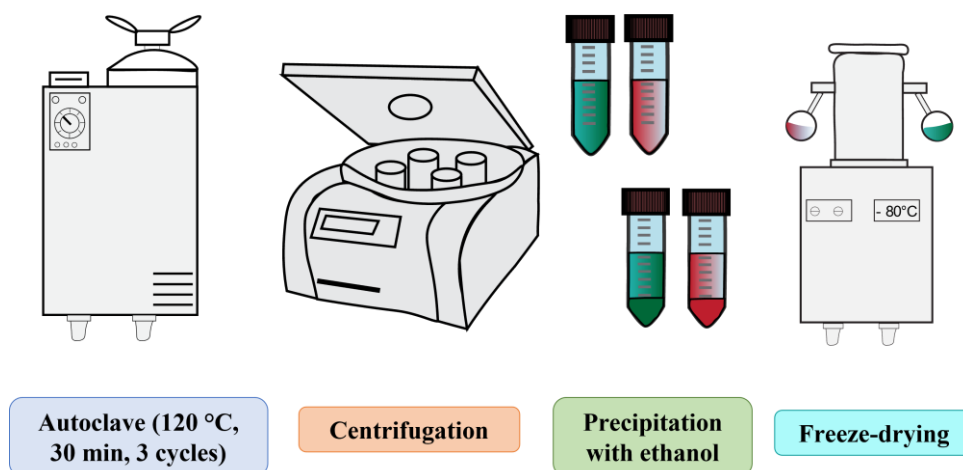


Figura 1. Representação ilustrativa do processo de extração dos polissacáridos a partir as amostras de algas secas de *Codium* sp. e *Osmundea* sp



3. Análise das propriedades físico-químicas e biológicas dos polissacáridos: estudo comparativo entre Galiza e Portugal e estações do ano

Após a extração dos polissacáridos, as propriedades físico-químicas e biológicas foram caracterizadas considerando um estudo comparativo entre as duas espécies, o local e a altura do ano em que ocorreu a recolha. Além disso, este trabalho sobre variações sazonais do polissacarídeo, teor de sulfato, composição de monossacarídeo e propriedades biológicas fornece orientação prática para determinar quais as condições “ideais” para a utilização destas algas no campo biomédico em função das propriedades físico-químicas e biológicas.

3.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS POLISSACARÍDEOS

3.1.1. ANÁLISE DE FTIR

Em geral, métodos espectroscópicos, como FTIR são geralmente usados como uma análise preliminar das propriedades moleculares de um polissacárido. Desta forma, o espectro FTIR de polissacáridos de *Osmundea* sp. e *Codium* sp (Figura 2) foi adquirido e comparado com standards comerciais, e confirmando a presença de grupos sulfato.

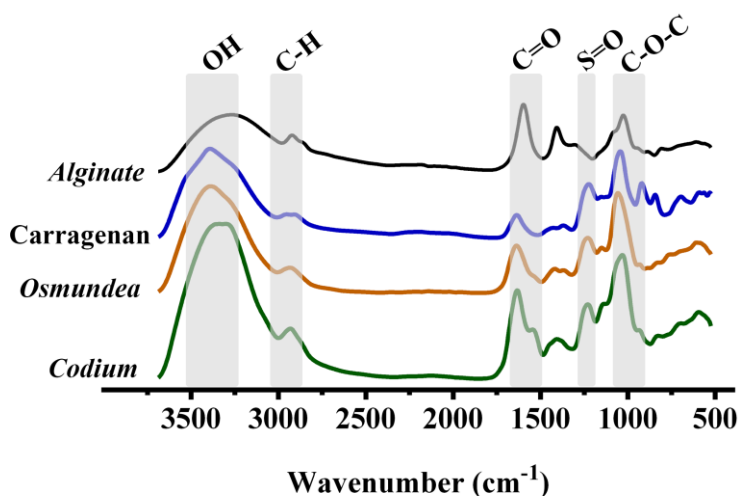


Figura 2. Espectro de FTIR dos polissacáridos extraídos de *Codium* sp. e *Osmundea* sp.

3.1.2. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA DE UV

A espectroscopia UV-visível foi usada para analisar os grupos cromóforos de átomos caracterizados por transições eletrônicas de forte absorção (Trabelsi, M'sakni, Ouada, Bacha, & Roudesli, 2009). O espectro de absorção UV-visível (mostrado na Figura 3) mostrou que todas as amostras apresentaram uma absorção máxima na faixa de 260 a 280 nm. Esses resultados indicam que o PS pode ser composto por diferentes compostos (proteínas, ácidos nucleicos) que contêm vários grupos de absorção de UV (Guo et al., 2020; Trabelsi et al., 2009) e que o local de recolha e a estação do ano constituem fatores que condicionam as propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, as propriedades biológicas dos polissacáridos.

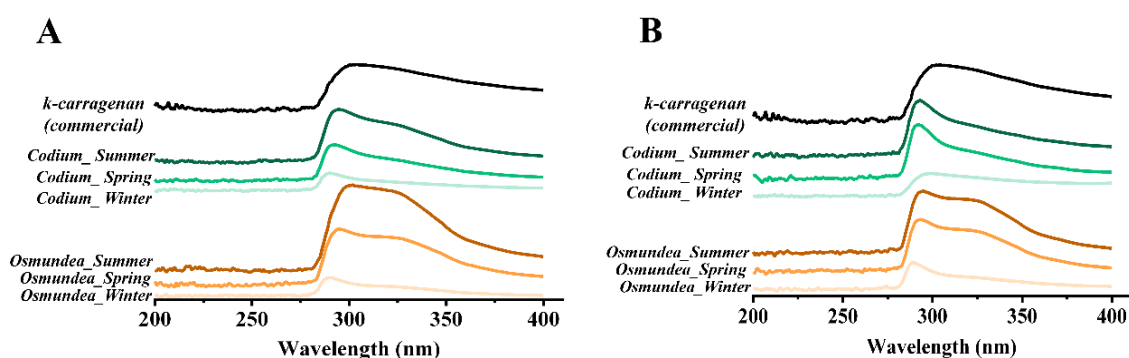


Figura 3. Espectro de UV dos polissacáridos extraídos a partir de amostras de *Codium* and *Osmundea* recolhidas em diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão) na costa de Portugal (A) e Galiza (B). O espectro de k-carragenano foi adquirido para fins de comparação.

3.1.3. DETERMINAÇÃO DA CARGA SUPERFICIAL

A carga superficial dos polissacáridos foi determinada através da análise DLS que permite suportar uma predição das possíveis interações com compostos e estruturas biológicas (Figura 4). Os resultados confirmam o caráter aniônico com valores de potencial zeta descritos como sendo importantes para evitar a agregação durante a circulação sanguínea. Por outro lado, os grupos carregados negativamente na superfície do polissacárido poderão ser importantes na produção de géis por gelificação iónica e na presença de catiões.

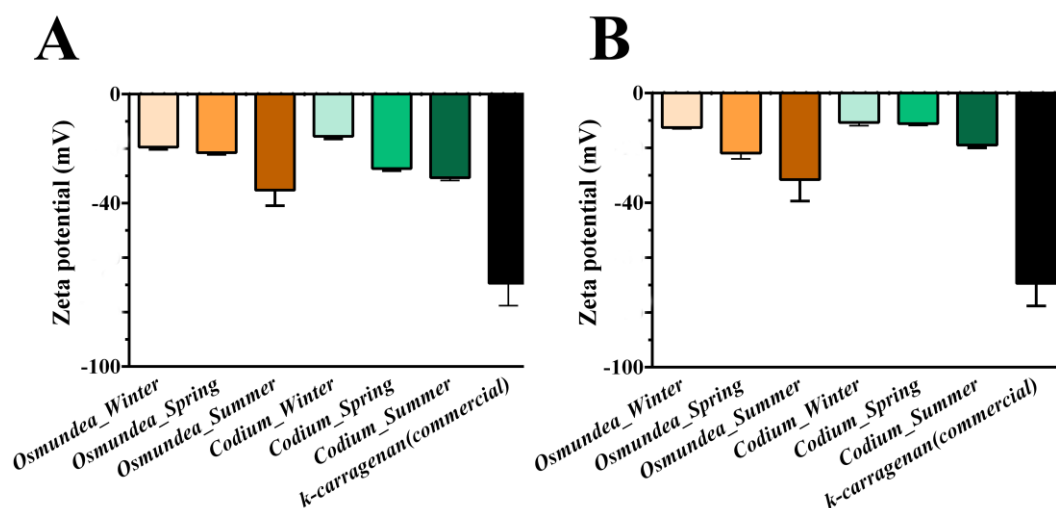


Figura 4. Determinação da carga superficial dos polissacáridos extraídos a partir de amostras de *Codium sp* and *Osmundea sp* recolhidas em diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão) na costa de Portugal (A) e Galiza (B). O k-carragenano foi usado como padrão.

3.1.4. PERCENTAGEM DE GRUPOS SULFATO

As algas marinhas são a fonte mais importante de polissacáridos sulfatados de origem não animal, e a estrutura química desses polímeros é variável de acordo com as espécies de algas. A concentração de grupos sulfato foi determinada através do método de turbidez de cloreto de bário-gelatina. A precipitação de iões sulfato é induzida por este método, e a turbidez resultante foi medida a 420 nm. O polissacarídeo extraído de *Osmundea sp*. proveniente da costa de Portugal (Figura 5A) apresenta maior concentração de grupos sulfato, registando-se ainda um aumento no verão, e de forma semelhante o mesmo foi observado nas amostras da costa da Galiza (Figura 5B). A presença de grupos sulfato nos polissacáridos confirma os resultados anteriores e as suas propriedades biológicas. É amplamente relatado que as algas sulfatadas possuem atividades biológicas tais como: antioxidante, anti-inflamatória e anticoagulante. Contudo, a relação entre a estrutura e a bioatividade ainda não está esclarecida. Para além disso, em estudos anteriores também se verificou o efeito da estação do ano no teor de polissacáridos e em que os meses de verão parecem ser mais produtivos (Rioux et al., 2009).

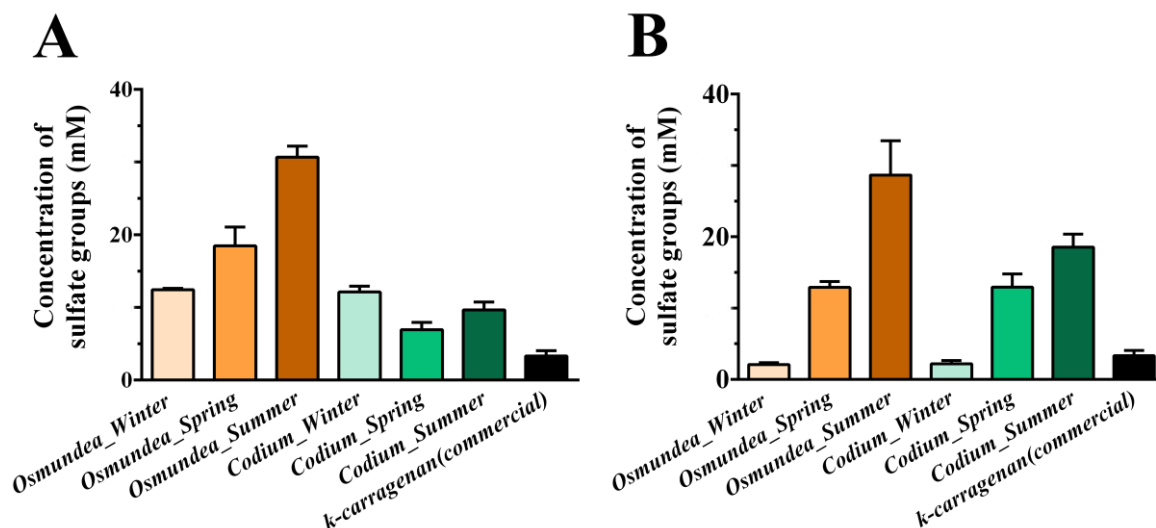


Figura 5. Quantificação da concentração de grupos sulfato dos polissacáridos extraídos a partir de amostras de *Codium sp* and *Osmundea sp* recolhidas em diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão) na costa de Portugal (A) e Galiza (B). O espetro de k-carragenano foi adquirido para fins de comparação.

3.1.5. PESO MOLECULAR

A distribuição do peso molecular das diferentes amostras de *Osmundea* da Galiza (GZ) e Portugal (PT), foi avaliada por cromatografia de permeação em gel de alta eficiência. As Figuras 6 e 7 mostram o cromatograma das amostras quando eluídas com água. É evidente a distribuição bimodal dos polímeros nas amostras. Foi observada uma fração correspondente a um peso molecular de polissacáridos significativamente superior a 150 kDa, e outra fração com peso molecular de aproximadamente 80 kDa. Não foram observadas diferenças significativas entre espécies e local de recolha (Galiza e Portugal). Contudo, esta análise foi repetida e a comparação entre as diferentes estações do ano está também a ser avaliada.

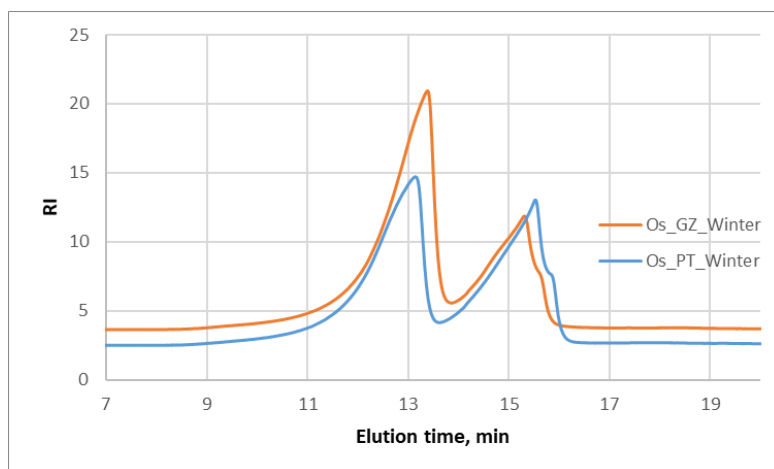


Figura 6. Cromatografia de permeação em gel de *Osmundea_GZ* e *Osmundea_PT*, usando água como eluente.

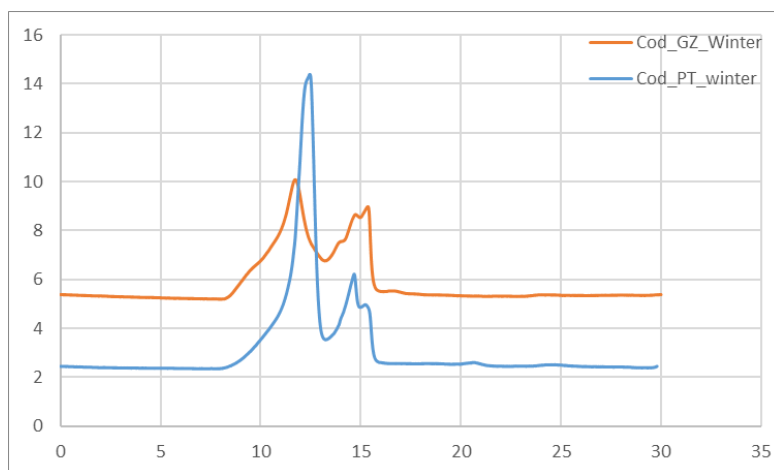


Figura 7. Cromatografia de permeação em gel de *Codium_GZ* e *Codium_PT*, usando a água como eluente.

3.1.6. COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES

Um dos pontos-chave na avaliação da composição dos monossacarídeos é a hidrólise efetiva do polissacarídeo em monossacarídeos, antes da identificação e quantificação dos monossacarídeos. No presente trabalho utilizou-se ácido sulfúrico a 4% (m/m) com taxas de recuperação entre 50 e 95%. A recuperação de baixo teor de açúcar obtida para algumas amostras não significa necessariamente que as condições de hidrólise utilizadas não foram adequadas e, ao invés, pode sugerir a presença de uma quantidade significativa

de polímeros não açucarados, como proteínas. A Tabela 1 apresenta os resultados para as diferentes amostras.

No presente trabalho foi utilizado ácido sulfúrico a 4% (m/m), obtendo-se uma recuperação de açúcar entre 50 e 95%. Estes valores podem ser atribuídos à presença de quantidades significativas de compostos não açucarados. Com base nos monossacarídeos usados como padrões, existem compostos não identificados no cromatograma. Apesar disso, fica claro que as algas PS possuem quantidades significativas de xilose, glicose, manose e arabinose, além da galactose, que é o monómero dominante. Além disso, os nossos resultados revelaram que o teor de glicose foi maior no inverno nas amostras recolhidas em Portugal, bem como para xilose, manose, galactose e arabinose no verão.

Relativamente ao PS da *Osmundea sp.*, o teor de monossacarídeos variou ao longo do ano e do local de recolha, em que a glicose foi maior na primavera nas amostras da costa da Galiza, e xilose, manose, galactose e arabinose no verão, correspondendo ao pico da vegetação. Os resultados destacam a relevância de tal caracterização uma vez que ambos os PS das macroalgas apresentaram uma diversidade de açúcares em percentagens variáveis dependendo da época e local de recolha.

Tabela 1. Composição de açúcares dos polissacáridos de *Osmundea* e *Codium* extraídos da costa de Portugal e Galiza.

	Osmundea						Codium					
	Spring		Summer		Winter		Spring		Summer		Winter	
	GZ	PT	GZ	PT	GZ	PT	GZ	PT	GZ	PT	GZ	PT
Celob	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lactose	0	4.9	0	0	0	0	4.0	3.6	3.9	0	0	6.2
NI	10.6	10.1	10.7	7.8	12.4	9.8	6.7	5.8	2.4	0	5.0	7.9
Glucose	8.4	5.8	4.9	2.4	5.6	2.3	28.1	37.7	29.6	31.3	29.1	41.7
XMG	50.1	53.2	51.0	66.7	50.8	55.1	46.1	42.5	47.1	52.9	31.6	34.4
Xylose	9.5	NI	10.2	6.7	9.7	9.9	5.1	3.4	5.2	3.7	3.2	5.8
Manose	1.5	NI	1.0	0.7	1.0	1.1	11.5	26.8	14.1	0.5	6.0	10.7
Galactose	39.1	NI	39.8	59.4	40.1	44.1	29.5	12.3	27.8	48.6	22.4	17.2
Arabinose	6.5	8.0	9.4	6.5	6.8	6.7	10.3	5.8	6.8	11.8	12.4	8.5
NI	0	1.4	0	0	0	0	0	0	2.3	0	4.7	0
Formic acid	4	6.8	4.1	3.5	4.7	7.1	2.9	3.0	4.8	0	15.5	0
NI	10.4	0	10.3	3.9	10.0	10.2	0	0	0	0	0	0
NI	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HMF	10	9.8	9.6	9.2	9.7	8.8	2.0	1.7	3.1	4.0	1.7	1.3

3.2. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS DOS POLISSACARIDEOS

3.2.1. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do polissacarídeo extraído de diferentes espécies de algas recuperadas na costa da Galiza e Portugal em diferentes épocas do ano foi avaliada e comparada. A atividade antioxidante dos polissacáridos das macroalgas podem ter um efeito positivo na saúde humana, uma vez que possuem propriedades protetoras contra danos induzidos por espécies reativas de oxigénio (ROS). Em particular, quando nos referimos às aplicações na área da engenharia de tecidos a atividade antioxidante é crucial, pois evita uma resposta inflamatória exuberante e prolongada. Desta forma, os compostos biológicos antioxidantes contribuirão para a progressão do processo de cicatrização de feridas e consequentemente evitarão a evolução de um processo de inflamação crónico. Assim, diferentes concentrações de polissacáridos de *Osmundea* sp. e *Codium* sp. foram testadas quanto à sua capacidade de limitar a produção de ROS através do ensaio DPPH, e usando o ácido ascórbico como controlo. Da análise dos resultados (Figuras 8 e 9) é possível confirmar que as amostras do verão apresentaram maior atividade antioxidante para ambas as espécies. Além disso, regista-se um aumento da atividade de eliminação de ROS proporcional à concentração de polissacarídeo em todas as amostras testadas. Estes resultados corroboram os resultados obtidos para os grupos sulfato, visto que os polissacáridos extraídos de amostras correspondentes ao verão também apresentaram maior concentração de grupos sulfato. Considerando os resultados obtidos, os polissacáridos extraídos de algas colhidas no verão são mais sulfatados e apresentam maior atividade antioxidante, e duas concentrações diferentes (5 mg/mL e 2 mg/mL) foram selecionadas para a avaliação *in vitro* das propriedades biológicas.

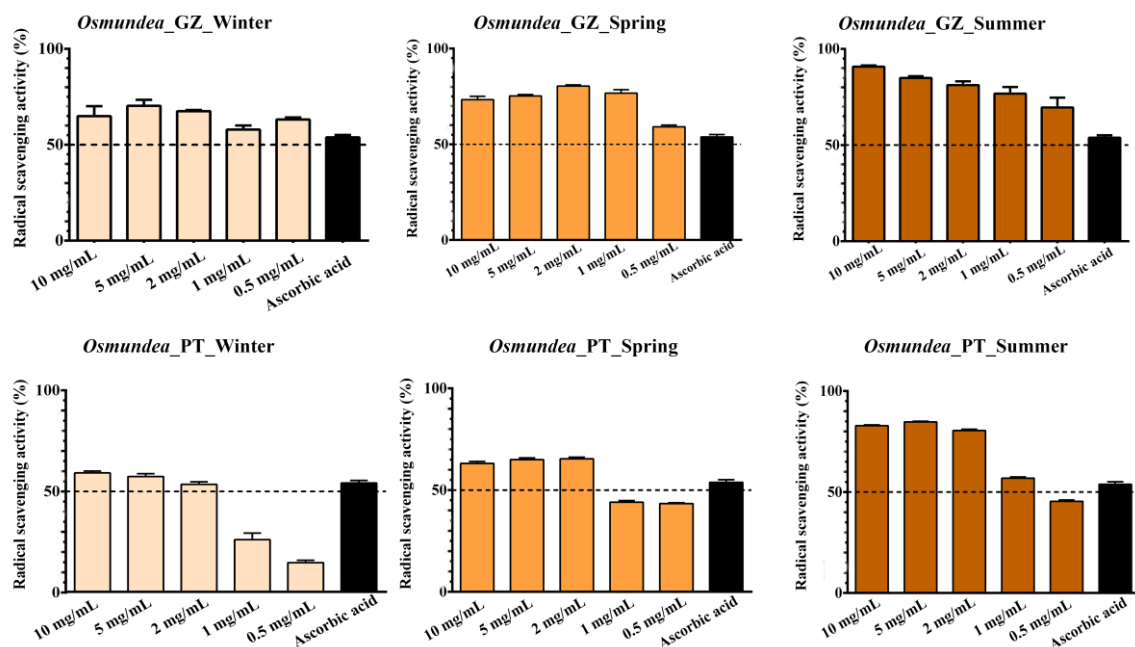


Figura 8. Determinação da atividade antioxidante, através do ensaio de DPPH, dos polissacáridos extraídos de *Osmundea* sp. recolhido na costa de Portugal e Galiza em diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão).

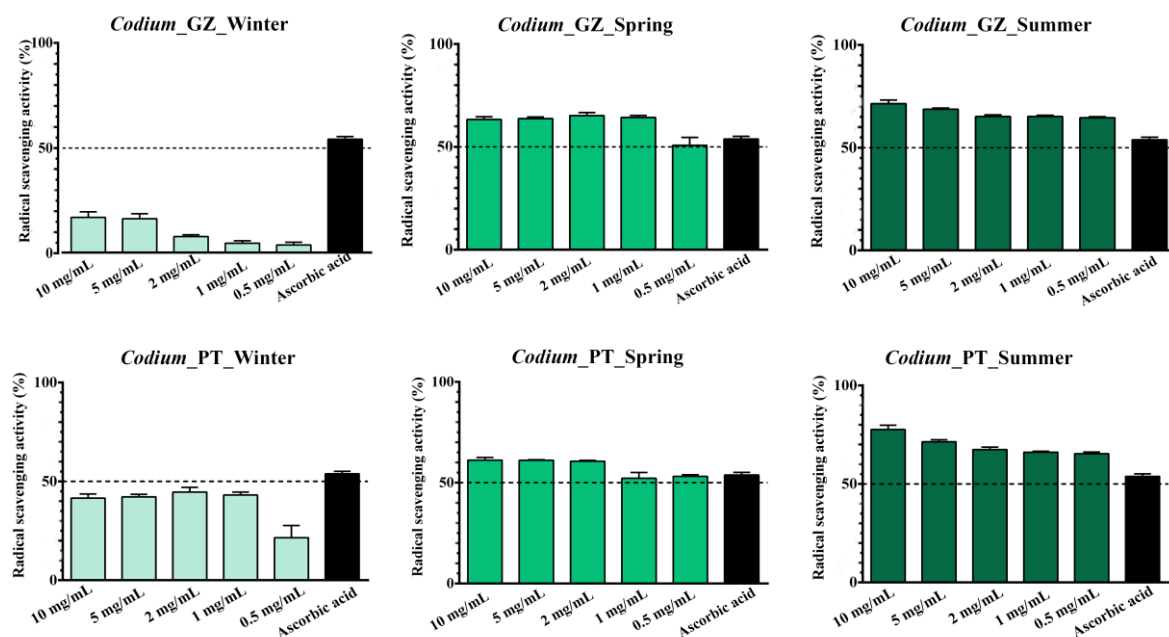


Figura 9. Determinação da atividade antioxidante, através do ensaio de DPPH, dos polissacáridos extraídos de *Codium sp.* recolhido na costa de Portugal e Galiza em diferentes estações do ano (inverno, primavera e verão).

3.2.2. BIOCOMPATIBILIDADE

Os polissacáridos de macroalgas têm sido apontados como uma excelente opção para diferentes aplicações biomédicas uma vez que esses compostos naturais possuem propriedades biológicas atrativas, como já referido anteriormente. Assim, neste trabalho, a sua citotoxicidade foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Para tal, foram selecionadas as amostras correspondentes ao verão (considerando os resultados obtidos em ensaios anteriores) e testadas duas concentrações (5mg/mL e 2 mg/mL). O polissacarídeo extraído de *Osmundea sp.* apresenta maiores valores de percentagem de viabilidade celular em ambas as concentrações (Figura 10). A concentração de 5mg/mL de polissacarídeo de *Codium sp.* proveniente da costa da Galiza revela-se citotóxico. Em contraste, amostras de *Codium sp.* com origem na costa de Portugal à mesma concentração produzem uma diminuição nos valores de viabilidade celular após 48h de incubação. Por outro lado, o polissacarídeo derivado de *Osmundea sp.* apresentou boa viabilidade celular, com os melhores resultados obtidos para a concentração de 2 mg/mL. Tais resultados evidenciam o potencial promissor destes polissacáridos para aplicações biomédicas, nomeadamente na engenharia de tecidos. Além disso o potencial biomédico dos recursos naturais marinhos na produção de matrizes que promovam o processo de cicatrização, evita o uso de materiais sintéticos, tóxicos e não degradáveis.

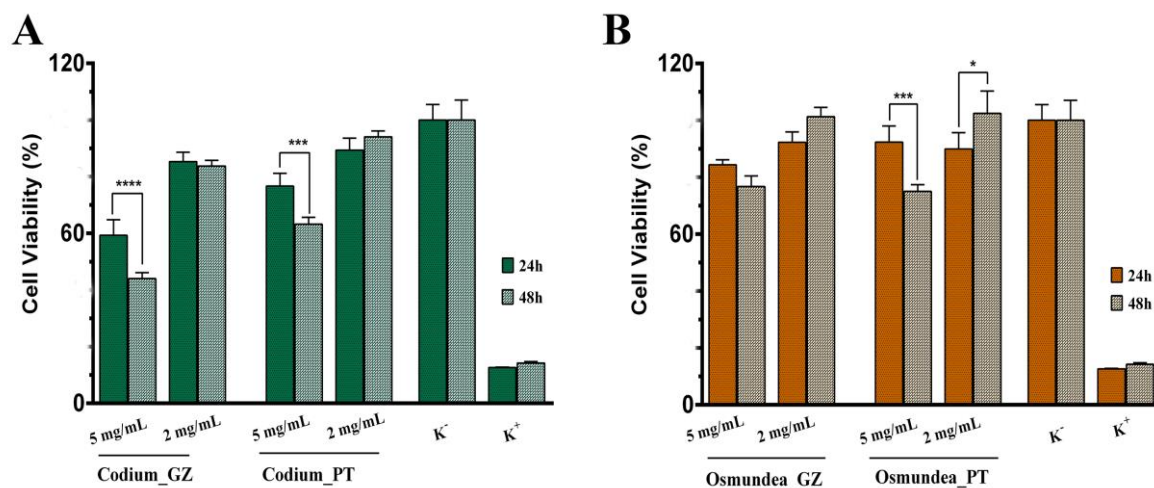


Figura 10. Caracterização da viabilidade celular dos fibroblastos em contato com os polissacáridos extraídos de *Codium* sp. e *Osmundea* sp. recolhidos na costa da Galiza e de Portugal no verão.

3.2.3. MIGRAÇÃO CELULAR

Considerando os resultados obtidos no ensaio de MTT, a concentração de 2 mg/mL foi selecionada para avaliar sua capacidade de induzir a migração celular de fibroblastos. Para tal, foi realizado o *scratch in vitro* assay, onde foram adquiridas as imagens microscópicas ao longo do tempo e calculada a área da ferida (Figura 11) durante 24 horas de incubação. Todas as amostras estimularam a capacidade migratória dos fibroblastos, sendo mais evidente para *Osmundea* sp. proveniente da costa de Portugal. Tais resultados estão em concordância com os resultados anteriores, e em que esta amostra foi a que exibiu maior percentagem de manose, grupos sulfato, atividade antioxidante e percentagem de viabilidade celular. Assim, é possível concluir que as características estruturais e físico-químicas do polissacarídeo predizem os seus efeitos biológicos e que sustentam a migração celular. Estes resultados comprovam assim o seu potencial de promoção do processo de cicatrização de feridas, promovendo a migração, adesão e proliferação de fibroblastos. Tal evento é crucial durante o tratamento das lesões cutâneas, uma vez que os fibroblastos são responsáveis pela produção de compostos da matriz

extracelular e segregam fatores de crescimento envolvidos no restabelecimento do tecido lesado.

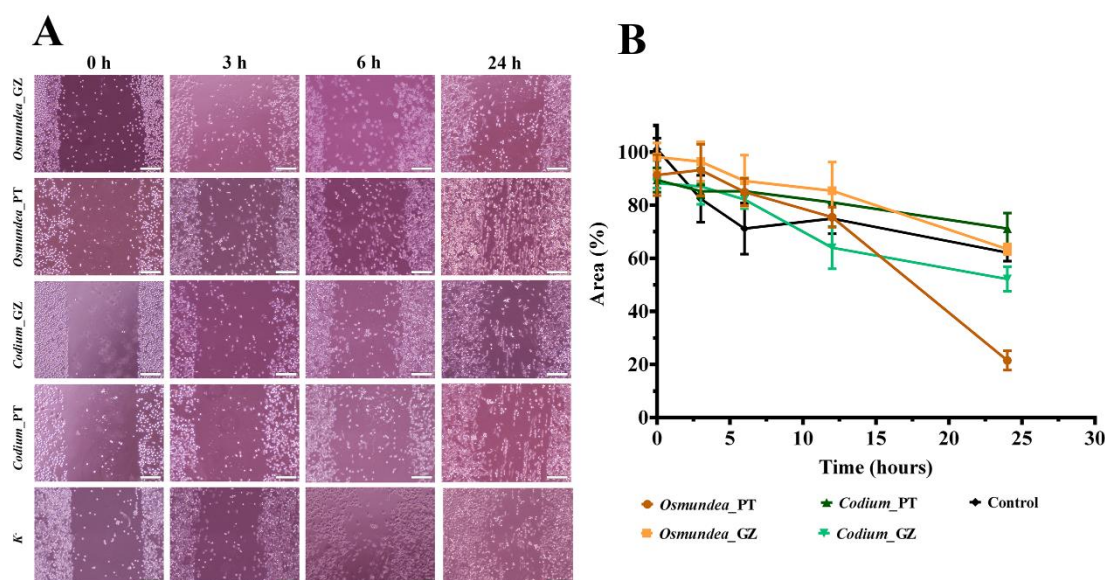


Figura 11. Efeito dos polissacáridos das algas na migração celular. Migração dos fibroblastos na presença de 2mg/mL de polissacáridos derivados de *Osmundea* sp. e *Codium* sp. da costa de Portugal e Galiza, e só em contacto com meio de cultura (controlo).

4. Produção de nanopartículas pelo polissacarídeo de *Osmundea* sp.

O estudo das propriedades físico-químicas do polissacarídeo de *Osmundea* sp suportou o uso na produção de nanopartículas (NP) poliméricas utilizando a técnica de *flash nanoprecipitation*. Através deste método, a interação eletrostática entre o polissacárido negativamente carregado e grupos carregados positivamente de quitosano é promovida por uma rápida mistura entre compostos (milissegundos). Além disso, o anti-inflamatório diclofenac (DLF) em concentrações de 1 mg/mL e 3mg/mL foi incorporado nas NP com o objetivo de desenvolver um sistema de entrega de fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias da pele. Assim, as NP produzidas foram definidas como CS_PS, enquanto que as NP que incorporaram DLF com as diferentes concentrações foram identificadas como CS_PS_DLF1 e CS_PS_DLF3, respectivamente.

4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES MORFOLÓGICAS DAS NANOPARTÍCULAS

A análise por DLS revelou que as NP apresentaram um diâmetro médio entre 80 a 98 nm (Figura 12), e com um aumento do seu tamanho com a incorporação do DLF, comprovando a sua capacidade de encapsulação, e de forma semelhante ao observado por outros autores para outros fármacos. Os tamanhos obtidos para as NP produzidas por nanocomplexação entre o polissacarídeo de *Osmundea* e quitosano apresentam um tamanho enquadrado no espectro de 100-500 nm, considerado como adequado para transportadores a serem utilizados em aplicações de entrega de medicamentos e na engenharia de tecidos.

Além disso, os valores obtidos para o potencial zeta revelaram que todas as NP produzidas possuíam uma carga negativa e indicando uma prevalência de grupos carregados negativamente, sugerindo a presença de polissacarídeo de *Osmundea sp.* na superfície da partícula. A adição de DLF não afetou a estabilidade das NP em suspensão considerando que mantem a sua carga $<-30\text{mV}$ e $>+30\text{ mV}$.

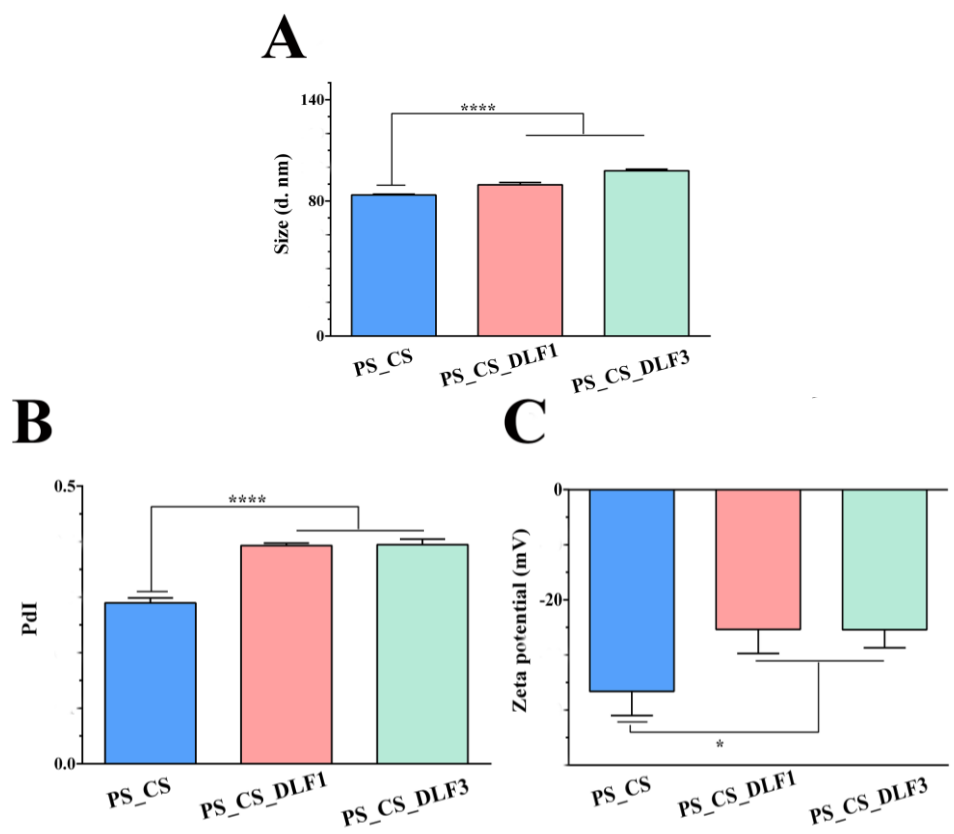


Figura 12. Avaliação das propriedades morfológicas das nanopartículas de CS_PS: determinação dos valores de diâmetro das nanopartículas (A), índice de polidispersividade (B) e potencial zeta (C).

4.2. AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

A estabilidade das nanopartículas foi também avaliada pela monitorização do tamanho ao longo de 28 dias, em que as soluções foram armazenadas a 4°C e temperatura ambiente (25°C) (Figura 13). Ao longo desse período o tamanho das NP manteve-se constante quando conservadas a 4°C. Estes resultados evidenciam a estabilidade das NP produzidas e sugerem elevada estabilidade na circulação sanguínea após a administração sistémica, podendo dever-se às fortes interações eletrostáticas entre os polissacáridos.

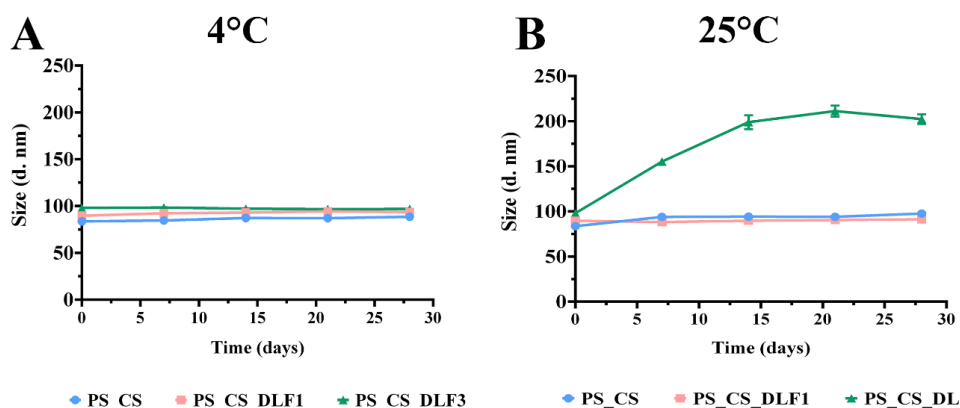


Figura 13. Determinação do tamanho das nanopartículas após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento a 4°C (A) e 25°C (B).

Os resultados obtidos demonstram que a técnica de nanocomplexação demonstrou a sua excelente eficiência para produzir nanopartículas baseadas em polissacáridos de *Osmunda sp.* com tamanho e estabilidade adequados para serem usadas em aplicações de entrega de medicamentos e/ou medicina regenerativa.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE LIBERTAÇÃO DO DICLOFENAC A PARTIR DAS NANOPARTÍCULAS

A eficiência de encapsulação obtida para a incorporação de DLF nas NP foi de 84%, indicando que o DLF pode ser encapsulado em nanosistemas usando a técnica de nanocomplexação. Posteriormente, a libertação *in vitro* de DLF das NP PS_CS foi investigada num ambiente fisiológico simulado de pele saudável e de feridas (PBS, pH 5.5 e pH 8). Como mostrado na Figura 6, o perfil de libertação do DLF exibe *burst* inicial ($\approx 45\%$ do DLF é libertado nas primeiras 20 h de incubação), seguindo por uma libertação mais sustentada durante pelo menos 140h. Este perfil de libertação pode estar relacionado com a alta proporção superfície/volume das NP que favorecem a difusão de DLF. A libertação acumulada de DLF das NP foi de 71% e 86% a pH5 e pH8, respectivamente. Tais diferenças podem ser explicadas pela protonação do quitosano em diferentes valores de pH. Está bem descrito que o CS é desprotonado a $\text{pH} > 7$, tornando a NP mais instável e suscetível à desintegração, resultando na libertação de DLF. Assim, o perfil de

libertação de DLF é compatível com a condição inflamatória (pH 8) e o pico da fase inflamatória no processo de cicatrização (1-3 d).

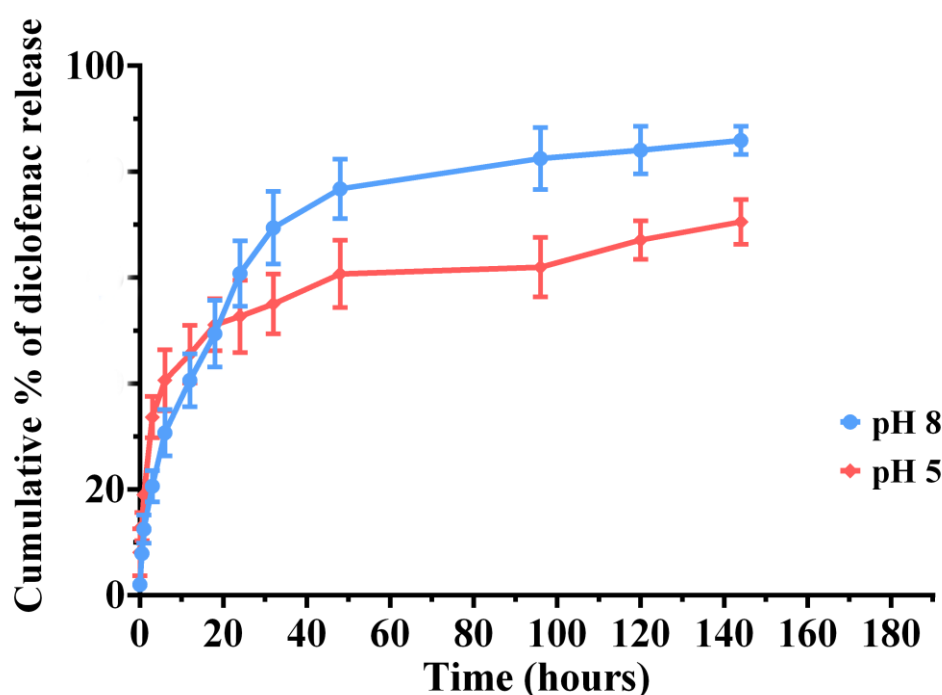


Figura 14. Caracterização do perfil de libertação do diclofenac a partir das nanopartículas a pH 5 (pH da pele nativa) e a pH 8 (pele lesada).

4.4. AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS

A biocompatibilidade das NP foi avaliada utilizando NHDF e queratinócitos (KEC) como modelos celulares. Estas células estão ativamente envolvidas em diferentes processos que ocorrem durante o processo de cicatrização da ferida, como a produção de compostos da matriz extracelular e a manutenção da camada protetora da epiderme. Os NHDF são células essenciais para a reparação tecidual sendo das primeiras células a aparecer nas lesões. Por sua vez, os KEC desempenham um papel significativo na resposta imune da pele, libertando citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, proteases e metaloproteinases da matriz [31-33]. No ensaio MTT verificou-se que concentrações de NP inferiores a 1 mg/mL não induziram efeito citotóxico nas células

NHDF (Figura 15) e KEC (Figura 16). No entanto, é relevante perceber que o aumento da concentração de DLF induz um decréscimo da viabilidade celular, o que confirma a toxicidade intrínseca do DLF [34, 35]. Por outro lado, os KEC parecem ser mais suscetíveis à ação das NP. Tal diferença observada entre NHDF e KEC pode estar relacionada com a taxa de proliferação celular dos KEC, uma vez que têm maior capacidade proliferativa do que NHDF, e secreção autocrina de fatores de crescimento tais como o fator de crescimento epidérmico, que são essenciais para as funções epidérmicas.

No geral, os resultados obtidos demonstraram o excelente desempenho biológico das NP produzidas com polissacarídeo de *Osmundea* e quitosano em concentrações inferiores a 1 mg/mL, que podem ser utilizadas como sistema de entrega de medicamentos no tratamento de distúrbios inflamatórios da pele.

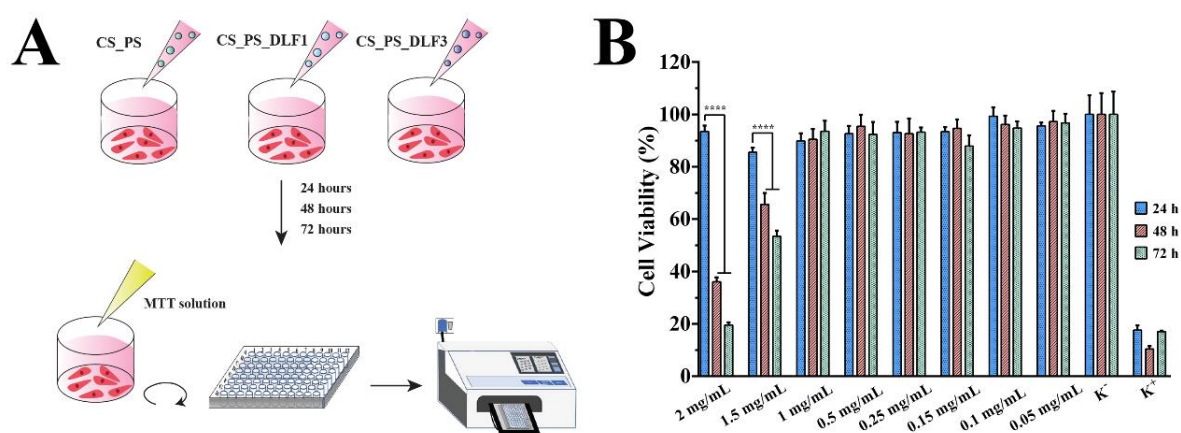


Figura 15. Representação ilustrativa da metodologia associada ao ensaio de MTT para caracterizar o perfil citotóxico das nanopartículas de PS_CS (B) a diferentes concentrações (2 mg/mL- 0.05 mg/mL) em contacto com fibroblastos humanos durante 24h, 48h e 72h.

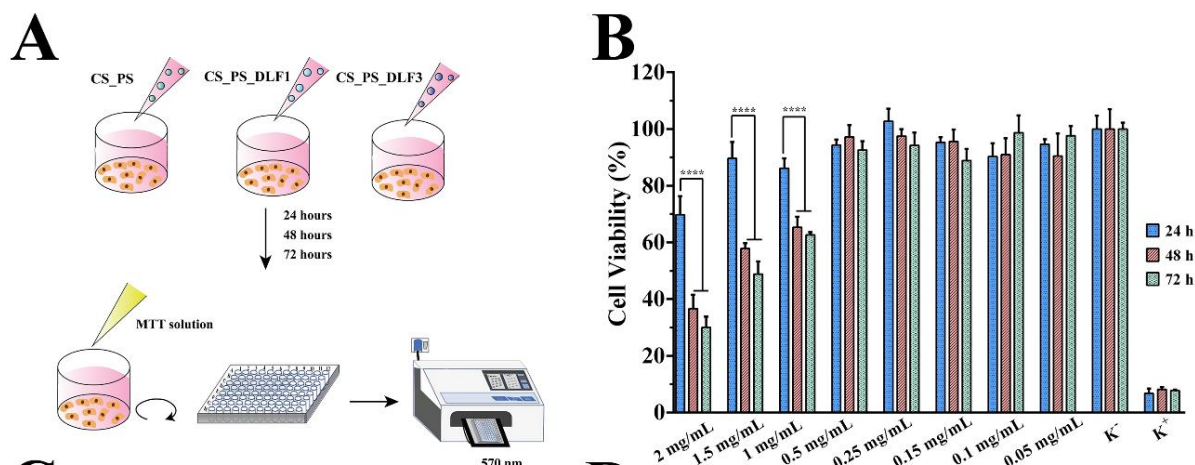


Figura 16. Representação ilustrativa da metodologia associada ao ensaio de MTT para caracterizar o perfil citotóxico das nanopartículas de PS_CS (B) a diferentes concentrações (2 mg/mL- 0.05 mg/mL) em contacto com queratinócitos humanos durante 24h, 48h e 72h.

5. Produção de nanopartículas metálicas mediadas pela biomassa de *Codium sp.*

Após o método de extração dos polissacáridos e biomassa residual foi reutilizada a fim de mediar a síntese “green” de nanopartículas metálicas. Neste caso, seleccionou-se o ião prata o qual foi reduzido através dos compostos bioativos que existem na biomassa das algas (tal como ilustrado na Figura 17). Este tipo de nanopartículas apresenta um elevado interesse para as aplicações biomédicas, uma vez que as NP apresentam atividade antibacteriana a qual é essencial no tratamento de infeções. Além disso, o uso de métodos alternativos considerados mais sustentáveis e amigos do ambiente constitui uma abordagem igualmente interessante no sentido de minimizar a toxicidade associada aos agentes redutores químicos normalmente usados na síntese química de nanopartículas de prata, bem como evitar o uso de estabilizadores. A presença de compostos bioativos na biomassa das algas contribui para potenciar as propriedades biológicas das nanopartículas bem como para melhorar a sua estabilização.

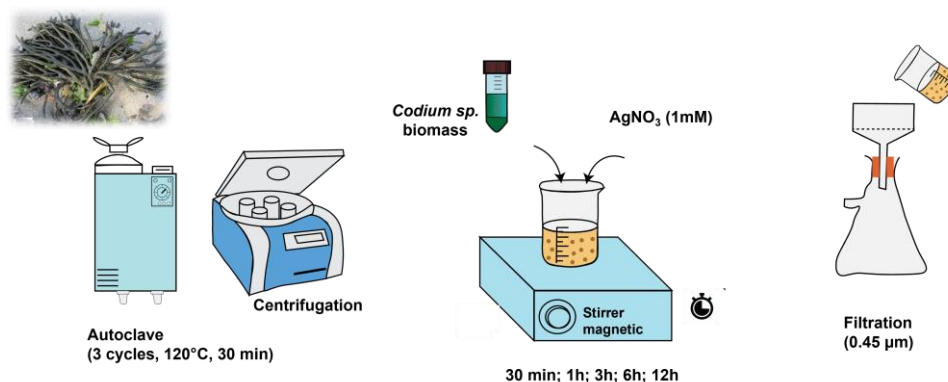


Figura 17. Representação ilustrativa da metodologia usada para a produção de nanopartículas metálicas.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O processo de síntese das nanopartículas de prata foi monitorizado através da espectroscopia de UV, com o surgimento do pico característico das nanopartículas na zona entre os 400-500 nm, como mostrado na Figura 18. Pode verificar-se que este pico se torna mais evidente a partir das 3h, indicando que a partir deste ponto, já existem nanopartículas de prata, ou seja, o ião nitrato de prata já foi reduzido pela ação dos compostos bioativos das algas.

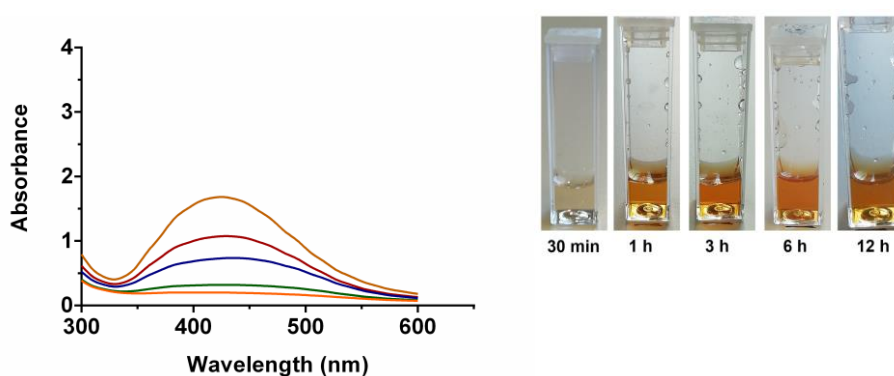


Figura 18. Espectro UV da solução de nanopartículas de prata a diferentes tempos de reação.

Após a otimização do processo de produção das nanopartículas de prata, o seu tamanho e carga superficial foram determinadas através da análise DLS. Como se pode observar na Figura 19, as nanopartículas apresentaram um valor de diâmetro aproximadamente de 50 nm, o qual se manteve constante durante pelos menos 14 dias após a sua produção. Tais evidências foram também observadas para os valores de carga superficial, as quais se mantiveram com carga negativa, com valores muito próximos de -20 mV.

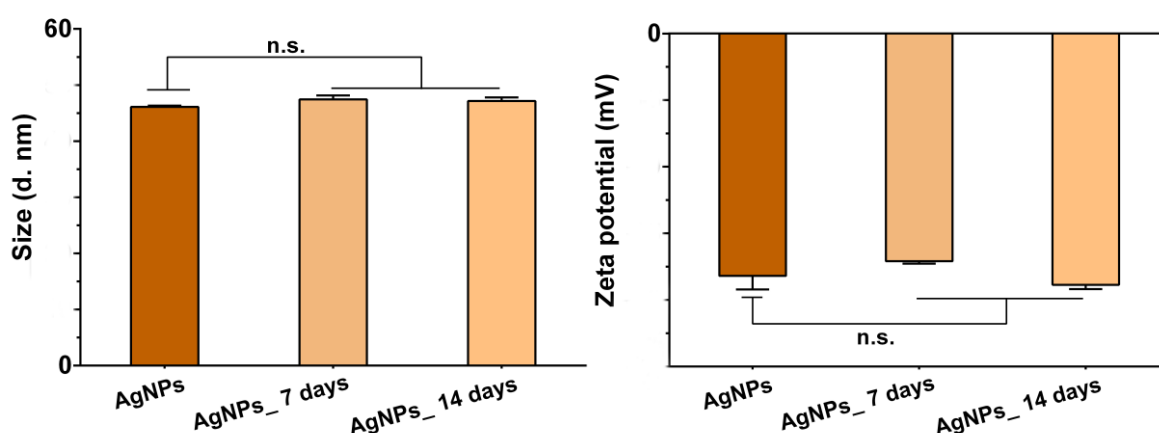


Figura 19. Determinação do tamanho e carga superficial das nanopartículas de prata ao longo de vários tempos.

As propriedades biológicas das nanopartículas de prata produzidas através de amostras de biomassa do *Codium sp.* foram avaliadas através do ensaio de MTT (Figura 20). Verificou-se que quando em contacto com fibroblastos humanos, estas nanopartículas não induzem nenhum efeito citotóxico em concentrações menores que 2.5 mg/mL.

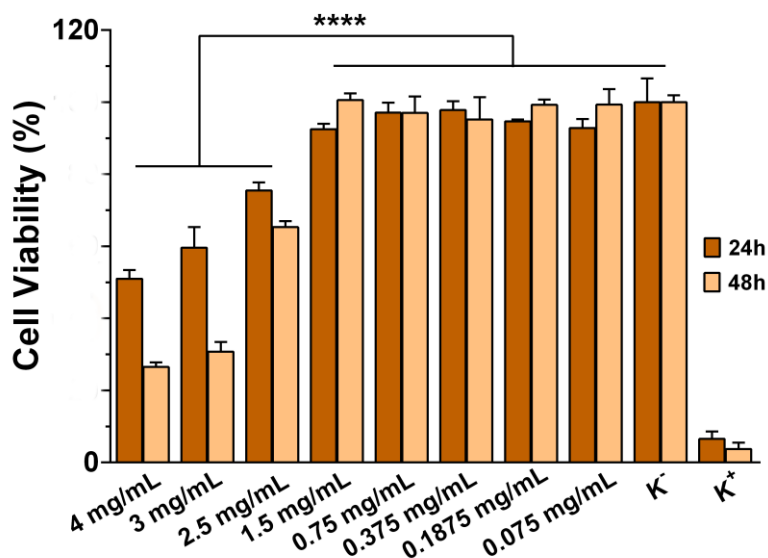


Figura 20. Determinação da viabilidade celular das nanopartículas de prata através do ensaio de MTT.

Uma vez que as nanopartículas de prata são amplamente reconhecidas pela comunidade científica devido à sua excelente atividade antimicrobiana, a concentração mínima inibitória e a concentração mínima letal das nanopartículas de prata produzidas por este método green, foi determinada em contacto com 3 estirpes bacterianas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*).

Os resultados obtidos revelaram que as nanopartículas de prata são mais eficazes contra a *E. coli*, enquanto que maiores concentrações de nanopartículas foram necessárias para comprometer o crescimento bacteriano da *S. aureus*.

Tabela 2. Determinação dos valores MIC das nanopartículas de prata para diferentes estirpes bacterianas.

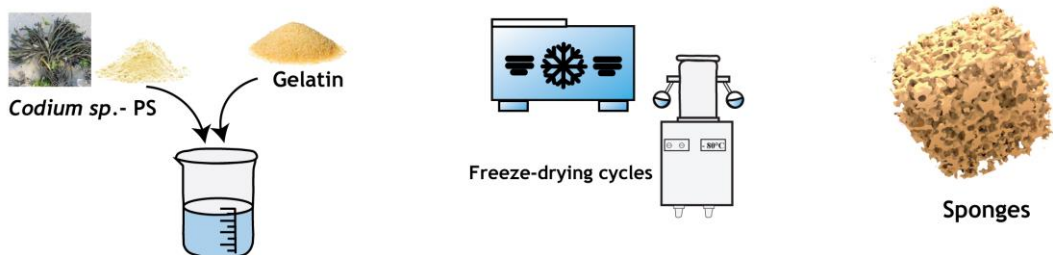
	MIC (mg/mL) AgNP	MLC (mg/mL) AgNP
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.06	0.125
<i>Escherichia coli</i>	0.03	0.03
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.125	0.25

6. Produção de esponjas com o polissacarídeo de *Codium sp.* incorporadas com as nanopartículas de prata

6.1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS ESPONJAS

Com o intuito de desenvolver um sistema 3D que possa incorporar as nanopartículas de prata anteriormente produzidas e caracterizadas, esponjas foram produzidas usando o polissacarídeo extraído a partir de *Codium sp.* As esponjas foram obtidas pelo método de liofilização e as nanopartículas de prata foram incorporadas através da imersão direta da esponja na solução de nanopartículas durante cerca de 16-18h (o qual se encontra ilustrado na Figura 21). Após o passo de imersão, as esponjas foram novamente liofilizadas e depois usadas nos diferentes ensaios.

1. Production of sponges



2. Incorporation of AgNPs into sponges

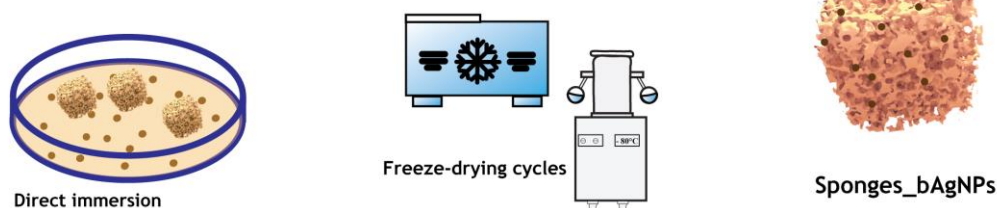


Figura 21. Representação ilustrativa da produção de esponjas incorporadas com nanopartículas de prata.

Um dos ensaios realizados foi a determinação da porosidade total das esponjas a fim e avaliar a capacidade das esponjas em promover a absorção de nutrientes, migração celular necessárias para o processo de cicatrização de feridas. Neste trabalho verificou-se que a incorporação das nanopartículas de prata no interior das esponjas promoveu um decréscimo na porosidade das esponjas para valores próximos de 40% (Figura 22). Estes

valores sugerem que as nanopartículas de prata “ocuparam” os espaços vazios da estrutura porosa da esponja. Por outro lado, este resultado também indica que a incorporação das nanopartículas de prata foi conseguida pelo método de imersão direta.

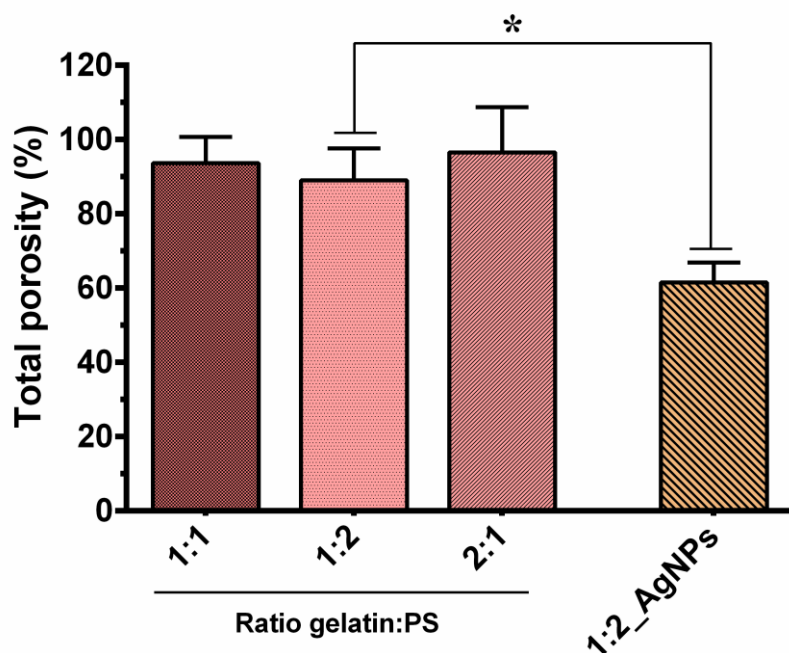


Figura 22. Determinação da porosidade total das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.

Por outro lado, a capacidade de absorção de exsudado por parte das esponjas foi também avaliado através do ensaio de swelling (Figura 23). Neste caso, o perfil de swelling obtido revelou que as esponjas apresentam uma elevada capacidade de absorção, o que será favorável para absorção do excesso de exsudado em feridas cutâneas, como é o caso das queimaduras.

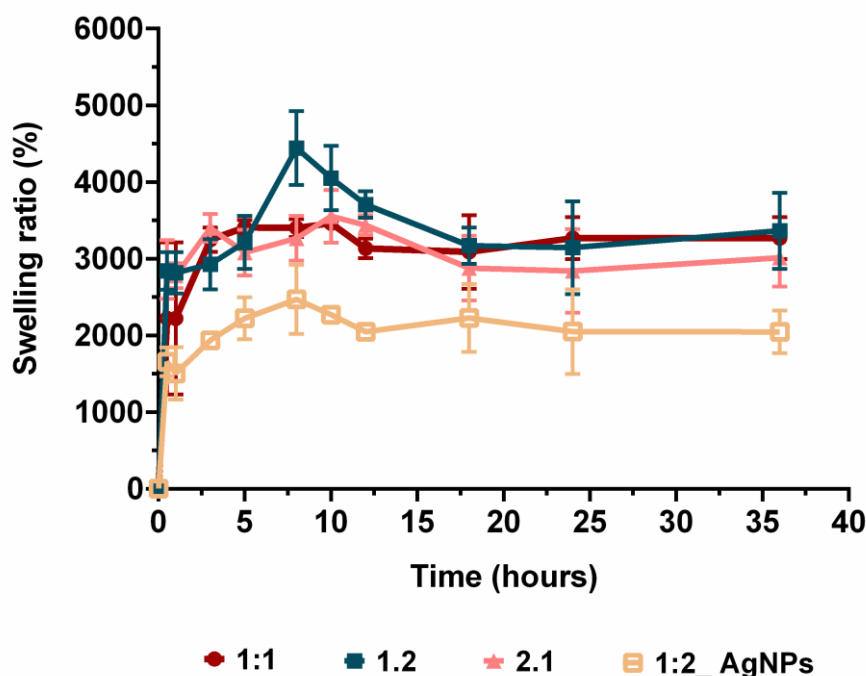


Figura 23. Caracterização do perfil de swelling das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.

O perfil de degradação das esponjas foi também estudado através da sua incubação numa solução de PBS durante 5 dias (Figura 24). Os resultados revelaram que as esponjas perderam cerca de 80% do seu peso depois de 5 dias, sendo este valor mais acentuado na formulação 1:1. Este perfil de biodegradação pode ter ocorrido devido à degradação química ou enzimática, a qual deve ser correspondente à taxa de formação de novo tecido de forma a evitar qualquer interferência com o processo de remodelação tecidular.

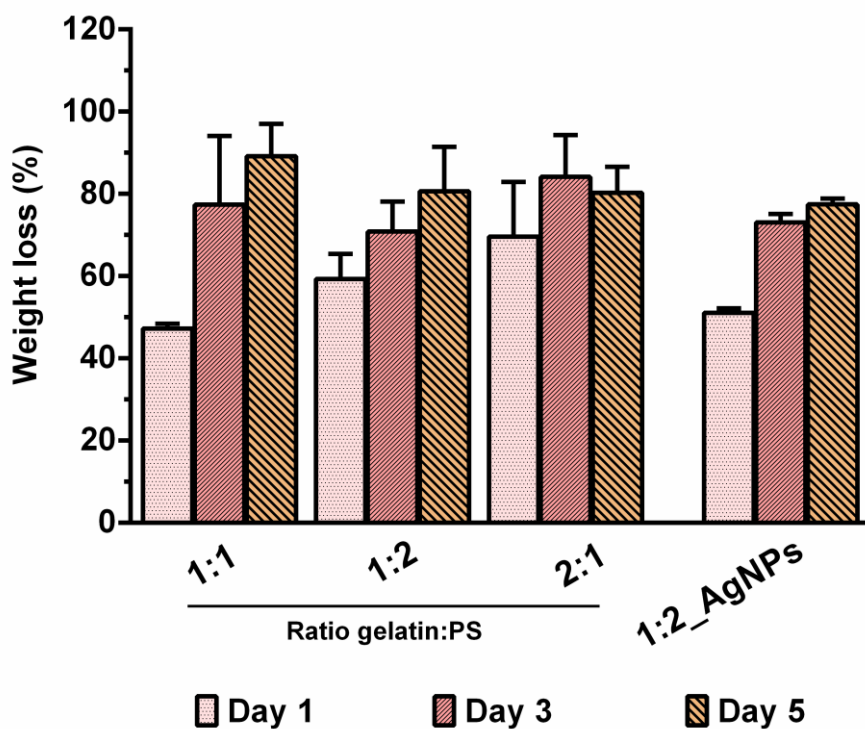


Figura 244. Caracterização do perfil de degradação das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.

6.2. AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS ESPONJAS

Por sua vez, a viabilidade das esponjas foi também avaliada em contacto com fibroblastos humanos através do ensaio de MTT. Verificou-se que as esponjas com e sem nanopartículas incorporadas não afetam a atividade metabólica das células durante pelo menos 48h de incubação.

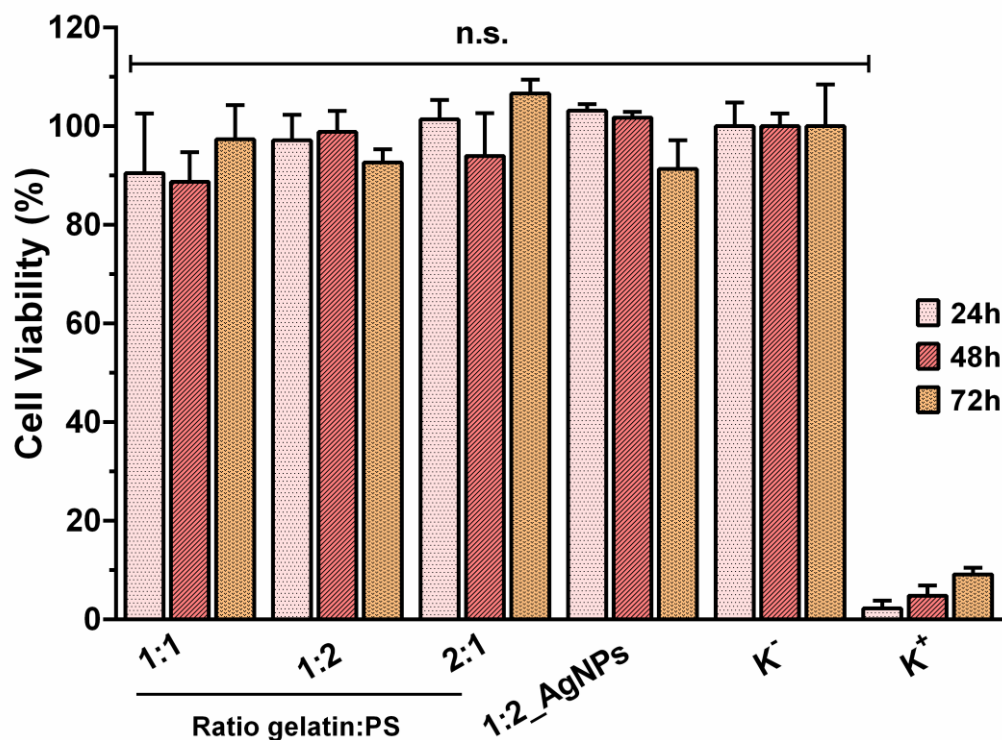


Figura 255. Determinação da biocompatibilidade das esponjas sem e com nanopartículas de prata incorporadas.

A atividade antibacteriana das esponjas com e sem as nanopartículas de prata foi determinada contra *S.aureus*. A atividade das AgNPs foi evidenciada quando as esponjas com AgNPs apresentam uma zona de inibição ao seu redor (Figura 26 A), enquanto que nas esponjas sem AgNPs incorporadas foi observado que houve crescimento bacteriano (Figure 26B).

Por outro lado, as esponjas incorporadas com AgNPs mostraram uma atividade antibacteriana contra a *S. aureus* com uma redução > 4 log das contagens de células viáveis após 6 h de exposição. Em contrapartida, ao utilizar a esponja sem AgNPs não foi observada redução (Figura 26 C).

Desta forma, as AgNPs produzidas por esta nova abordagem “green” revelaram-se mais estáveis, biocompatíveis e exibem efeitos antibacterianos contra os microrganismos testados. Além disso, os métodos “green” permitem a obtenção de nanopartículas metálicas sem o uso de solventes orgânicos, que são tóxicos para a saúde humana e para o meio ambiente.

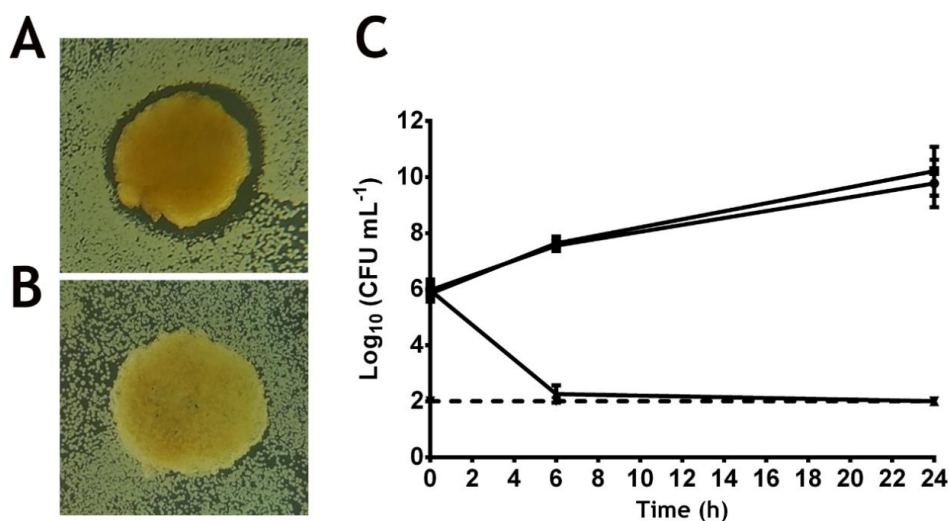


Figura 266. Atividade antibacteriana das esponjas em contacto com a *S.aureus*, quando incorporados com AgNPs (A), e sem AgNPs (B). Número de células viáveis de *S.aureus* no grupo controlo (●) , e esponjas com (▲) e sem AgNPs (■) incorporadas a diferentes tempos de incubação (0, 6 e 14 horas).

7. Conclusões

O presente relatório resumiu as principais atividades desenvolvidas no âmbito do projeto ALGALUP, a cargo da equipa de investigação do Instituto Politécnico da Guarda. O estudo aprofundado das propriedades biológicas dos recursos naturais de origem marinha é uma área de investigação em crescente expansão. Com este projeto foi possível verificar que os compostos bioativos derivados das macroalgas possuem diversas propriedades de elevado interesse para as aplicações biomédicas.

É ainda importante salientar que alguns dos resultados aqui apresentados já estão publicados (<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.01.180>) e outros encontram-se submetidos em revistas internacionais pelo que constituem conteúdo sensível de divulgação até à sua publicação junto da comunidade científica.