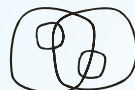




Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Investimos en su futuro



PROGRAMA
COOPERACIÓN TRANSFRONTERIZA
ESPAÑA - PORTUGAL
COOPERAÇÃO TRANSFRONTEIRIÇA
2007 - 2013



VALORIZAÇÃO DOS RECURSOS MARINHOS: Biomateriais em Regeneração de Tecidos e Libertação de Fármacos

VALORIZACIÓN DE RECURSOS MARINOS: Biomateriales en Regeneración de Tejidos y Liberación de Fármacos

Coordenadores/Coordinadores:

Carmen González Sotelo

Pilar Sieiro Piñeiro

Julio Maroto Leal

José A. Vázquez

Ricardo I. Pérez Martín

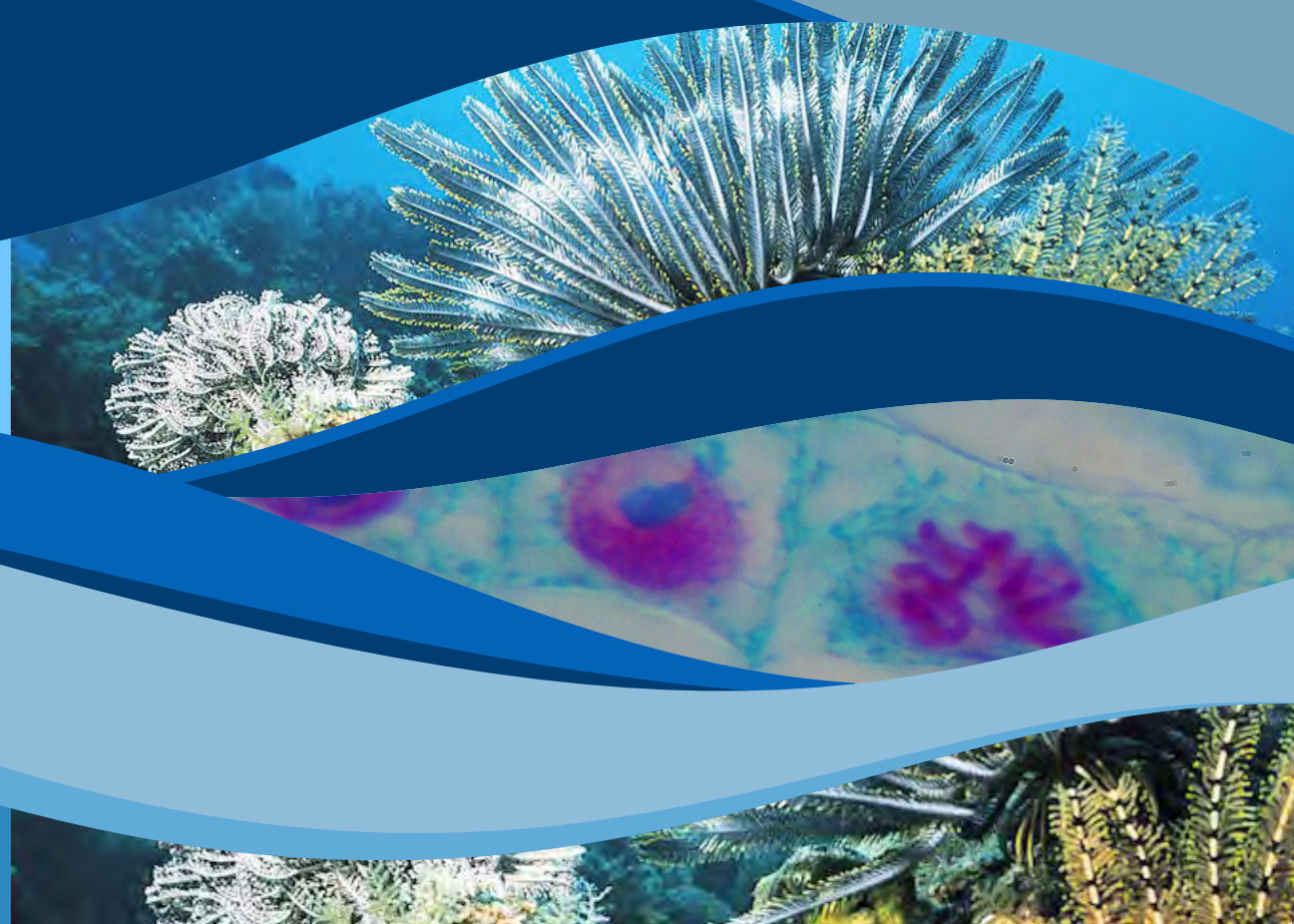
Tiago H. Silva

Rui L. Reis

VALORIZAÇÃO DOS RECURSOS MARINHOS: Biomateriais em Regeneração de Tecidos e Libertação de Fármacos
VALORIZACIÓN DE RECURSOS MARINOS: Biomateriales en Regeneración de Tejidos y Liberación de Fármacos



9 788460 183120 4



VALORIZAÇÃO DOS RECURSOS MARINHOS:
Biomateriais em Regeneração de
Tecidos e Libertação de Fármacos

VALORIZACIÓN DE RECURSOS MARINOS:
*Biomateriales en Regeneración de
Tejidos y Liberación
de Fármacos*

Coordenadores/Coordinadores:

Carmen González Sotelo

Pilar Sieiro Piñeiro

Julio Maroto Leal

José A. Vázquez

Ricardo I. Pérez Martín

Tiago H. Silva

Rui L. Reis

Editor:

Grupo de Bioquímica de Alimentos
Instituto de Investigaciones Marinas
Consejo superior de investigaciones científicas (CSIC)

Diseño e impresión:
Tórculo Comunicación Gráfica, S.A.

ISBN: 978-84-608-3120-4

D.L: V 0000 -2015

ÍNDICE

BIOMATERIAIS EM REGENERAÇÃO DE TECIDOS *BIOMATERIALES EN REGENERACIÓN DE TEJIDOS*

**Biocerâmicas obtidas a partir de diente de tiburón
para aplicaciones biomédicas 17**

**Recubrimientos cerámicos
multisustituídos de origen marino 35**

**Colagéio Marinho: valorização de subprodutos marinhos
com vista à regeneração de tecidos 49**

**Estrutura e propriedades do ulvano, um polissacarídeo
sulfatado de origem marinha. 79**

**Polissacarídeos de origem marinha para aplicação em
estratégias de engenharia de tecidos 107**

**Hidroxiapatita de origen marino obtenida a partir de
espinas de pescado 147**

**Nanopartículas de fosfato cálcico de origen marino
para aplicaciones biomédicas 173**

**Materiais à base de fosfato de cálcio de origem marinha
para aplicações biomédicas 189**

SISTEMAS DE LIBERTAÇÃO DE FÁRMACOS *LIBERADORES DE FÁRMACOS*

**Polissacarídeos de origem marinha aplicados à libertação
controlada de agentes bioativos. 203**

**Polisacáridos de origen marino como excipientes
farmacéuticos en la fabricación de medicamentos 247**

PRÓLOGO

É sempre importante sublinhar que os recursos naturais são limitados e finitos. De facto, apesar de serem recursos renováveis, a taxa de renovação é muitas vezes insuficiente para compensar a exploração a que são sujeitos. A Política Comum das Pescas, PCP, estabelecida pela União Europeia e atualmente em vigor, também modificou os seus conteúdos de forma a refletir esta realidade. Hoje sabemos que a única economia estruturalmente estável e com possibilidades de prevalecer no tempo é a “Economia Sustentável”, ou seja, aquela cuja filosofia defende a renovação e a proteção das matérias-primas e dos recursos que são a base de qualquer atividade industrial.

A atividade das pescas não é alheia a esta dinâmica, mas o facto de ser gerada uma grande quantidade de resíduos e subprodutos que é apenas parcialmente aproveitada representa um contraste significativo entre o espírito das regras e a prática estabelecida. Para além disso, o enorme potencial destes resíduos e subprodutos é bem conhecido, tal como a necessidade de fazer uma utilização mais eficaz das matérias-primas se mostra a cada dia como um dos pilares da economia. É por isso necessário obter maior valor deste novo leque de matérias-primas e introduzi-las em canais comerciais que resultem em empresas especializadas na sua valorização. É fundamental olhar para os sectores de maior valor acrescentado, nomeadamente as áreas biomédica, cosmética e farmacêutica, considerando-os como mercados-alvo para novas tecnologias e produtos desenvolvidos a partir desses resíduos e subprodutos marinhos que constituem, assim, uma nova gama de matérias-primas.

Por outro lado, existe uma multitude de organismos marinhos, especialmente invertebrados e algas, que representam um reservatório imenso, mas ainda pouco estudado, de compostos bioativos e outras biomoléculas com grande relevância em diferentes campos da indústria. A valorização de todos estes recursos é assim uma enorme oportunidade,

mas também um importante desafio que se coloca aos cientistas, às empresas e à sociedade em geral.

O termo valorização tem sido muito utilizado nos últimos anos, mas ainda comumente associado a produtos derivados tradicionais. Todavia, as oportunidades são cada vez mais amplas e em alguns casos, a aplicação final é de tal forma inesperada e disruptiva que se traduz num avanço tecnológico marcante.

É precisamente esta orientação no sentido do elevado valor acrescentado que constitui o tema que nos ocupa e que dá conteúdo ao presente livro. De facto, é surpreendente que a partir de subprodutos de origem marinha se possam desenvolver aplicações biomédicas relacionadas com a medicina regenerativa e, igualmente, a utilização de certos compostos em farmacologia na produção de sistemas de transporte e libertação de fármacos. Mas essa é já uma possibilidade real e este livro pretende ser um testemunho claro desse campo de investigação e de aplicação industrial

Este volume é a continuação de um outro editado anteriormente no âmbito do projecto MARMED (Development of innovating biomedical products from marine resources valorisation, co-financiado pelo Programa Operacional de Cooperação Transnacional Espaço Atlântico 2007-2013), dedicado à valorização de recursos marinhos focada em produtos nutracêuticos e a moléculas com actividade terapêutica. O presente surge no âmbito do projecto NOVOMAR (Novos usos do mar, co-financiado pelo Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha Portugal 2007-2013), que apresenta objetivos convergentes com os do projeto anterior. As suas equipas, que partilham alguns dos seus membros, procuram desta forma estabelecer uma coleção de livros complementares na temática da valorização dos recursos marinhos direcionada para a saúde e bem-estar do Homem, respondendo claramente à missão de fomentar o aproveitamento dos resíduos das pescas e das indústrias processadoras de pescado e incrementar o conhecimento e a utilização dos recursos marinhos em geral.

Tratando-se de um livro gerado por um projecto onde se misturam duas culturas em grande medida comuns e geograficamente transfronteiriças, considerou-se apropriado respeitar as línguas de origem dos autores para marcar assim o equilíbrio e o espírito de colaboração manifestado por todos os participantes nesta iniciativa.

Este livro não se teria tornado realidade se não tivesse contado com a colaboração dedicada mas desinteressada de um amplo número de profissionais; o nosso empenho não teria sido eficaz sem a generosa contribuição dos autores. Estamos em dívida com todos os cientistas que deram forma e conteúdo ao texto e a todos eles deixamos nestas páginas um agradecimento e reconhecimento pelo seu esforço e compromisso altruístas.

Mas o trabalho de todos não teria significado sem si, o leitor, a quem agradecemos o tempo que dedica a estas páginas e a quem esperamos conseguir transmitir uma mensagem de esperança na valorização sustentável dos recursos marinhos de todos, para todos!

Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo · CSIC

Centro Tecnológico del Mar · Fundación CETMAR

Grupo de Investigação 3B's · Universidade do Minho

PRÓLOGO

Conviene recordar que los recursos naturales son limitados y finitos. De hecho, a pesar de ser recursos renovables, su tasa de renovación es muchas veces insuficiente para compensar la explotación a la que son sometidos. La PCP, Política Pesquera Común, propugnada por la Unión Europea y actualmente vigente, también modificó sus contenidos de tal forma que refleja esta realidad. Hoy día sabemos que la única economía estructuralmente estable, y con posibilidades de prevalecer en el tiempo, es la "sostenible", es decir, aquella cuya filosofía aboga por la renovación y cuidado de las materias primas y los recursos en que se fundamenta cualquier actividad industrial.

La actividad pesquera no es ajena a esta dinámica, pero el hecho de generar una gran cantidad de subproductos que sólo son aprovechados parcialmente representa un contraste significativo entre el espíritu de las reglas y la práctica establecida. Igualmente, es conocido el enorme potencial de dichos subproductos y la necesidad de hacer un uso completo de las materias primas se abre paso cada día como uno de los baluartes de la economía. Es por tanto necesario obtener mayor valor de estas materias primas e introducirlas en canales comerciales que desemboquen en empresas especializadas en la valorización. Es fundamental fijarnos en los sectores de mayor valor añadido como el biomédico, cosmético y farmacéutico y considerarlos como mercados objetivo para las nuevas tecnologías y productos desarrollados a partir de esos subproductos marinos que constituyen, de esta forma, una nueva gama de materias primas.

De la misma manera, multitud de organismos marinos, especialmente invertebrados y algas, representan un reservorio inmenso, aún por investigar, que atesora un sin fin de compuestos bioactivos y otras biomoléculas de sumo provecho en distintos campos de la industria. La valorización de todos estos recursos significa una enorme oportunidad a la vez que un importante desafío que se ofrece a los científicos, a

las empresas y a la sociedad en general. El término valorización se ha utilizado mucho en los últimos años pero todavía comúnmente asociado a productos derivados tradicionales. Sin embargo, sus posibilidades son cada vez más amplias y, en algunos casos, el destino final que pudiera darse a estos recursos es tan inesperado y disruptivo que se traduce en un avance tecnológico destacable. Este enfoque es precisamente el enorme valor añadido que constituye el tema que nos ocupa y que dará contenido al presente libro. De hecho, resulta cuando menos chocante, que a partir de subproductos de origen marino se puedan desarrollar aplicaciones biomédicas relacionadas con la medicina regenerativa y, de igual modo, es bastante desconocido el uso de ciertos compuestos en farmacología en la producción de sistemas de transporte y liberación de fármacos. Ciertamente es así; esta es una posibilidad real y la finalidad que subyace en esta iniciativa es que este libro sea un testimonio claro dedicado a este campo de la investigación y de su aplicación industrial.

Este volumen es la continuación de otro editado anteriormente dentro del contexto del proyecto MARMED (Development of innovating biomedical products from marine resources valorisation) co-financiado por el Programa Operativo de Cooperación Transnacional Espacio Atlántico 2007-2013, dedicado a la valorización de recursos marinos pero circunscribiéndose a los productos nutracéuticos y las moléculas con actividad terapéutica. El presente es una iniciativa nacida al amparo del proyecto NOVOMAR (Nuevos usos del mar) co-financiado por el Programa Operativo de Cooperación Transfronteriza España-Portugal 2007-2013. Ambos proyectos son convergentes en sus intenciones y, de hecho, sus consorcios están formados por miembros que han estado presentes en ambos. De esta forma, con la edición de estos libros complementarios pretenden centrarse en la temática de la Valorización de los Recursos Marinos encaminada hacia la salud y el bienestar del ser humano. Así, se responde claramente a la vocación de ambos proyectos por fomentar el aprovechamiento de los subproductos pesqueros y de las industrias procesadoras de pescado e incrementar el conocimiento y uso de los recursos marinos en general.

Dado que se trata de un libro nacido a la sombra de un proyecto en donde se mezclan dos culturas en gran medida comunes y geográficamente fronterizas, y teniendo igualmente presente que las aportaciones que le

dan forma y fondo fueron hechas en distinta lengua, se consideró oportuno respetar los idiomas de origen de los autores para así acentuar el equilibrio y el espíritu de colaboración manifestado por todos los participantes en esta iniciativa.

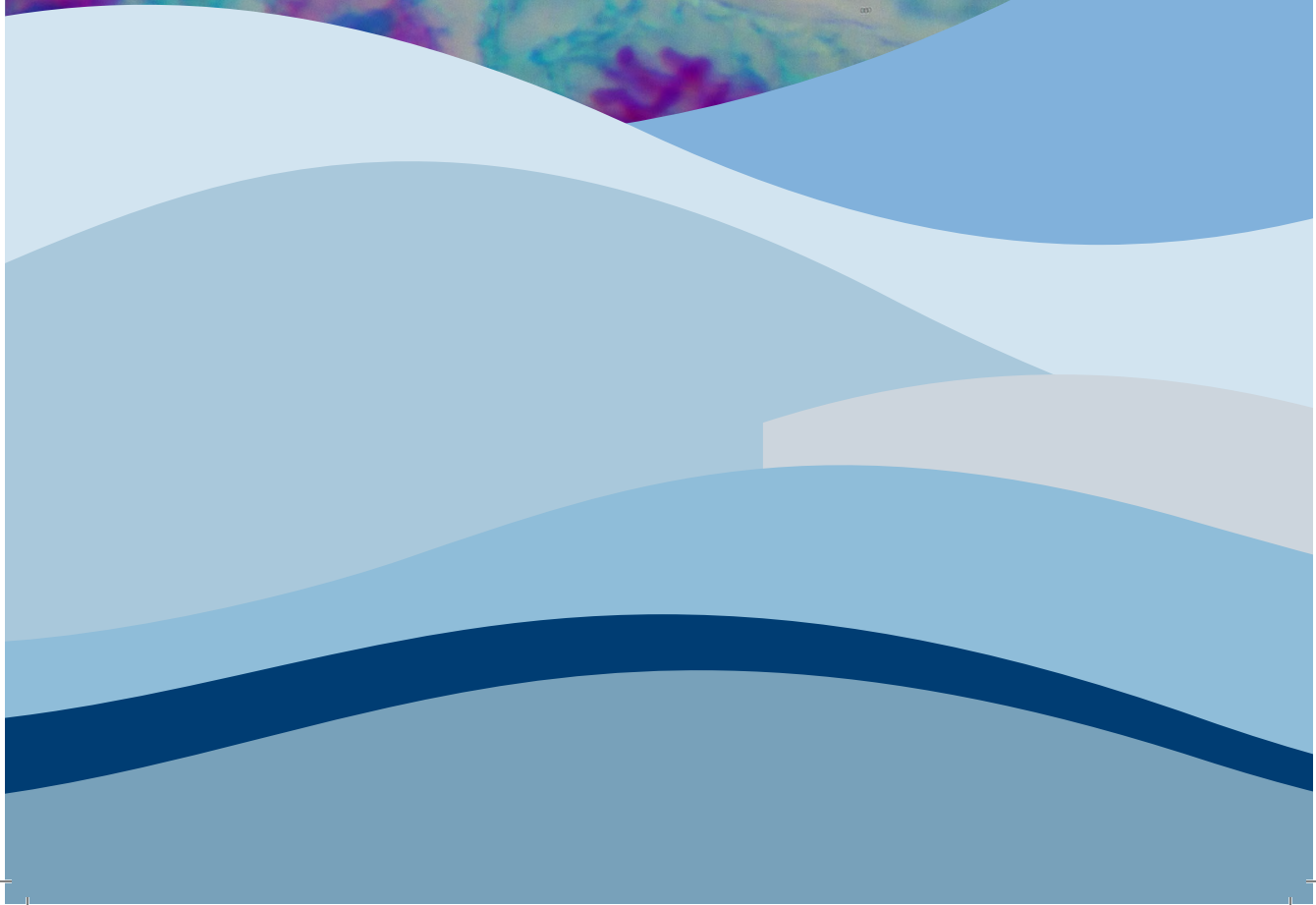
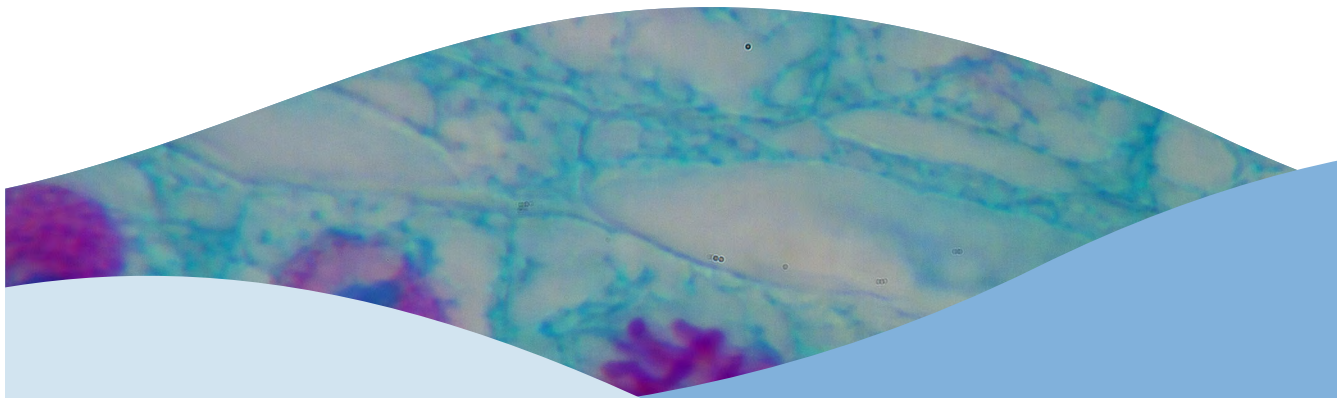
Este libro no hubiera llegado a ser una realidad de no haber contado con la desinteresada colaboración de un amplio número de profesionales; nuestro empeño no hubiera llegado a buen puerto de no mediar su generosa aportación. Estamos en débito con todos los científicos que han dado forma y contenido al texto. A todos ellos, desde estas páginas, agradecemos su altruista esfuerzo y compromiso, y dejamos constancia de nuestra gratitud y reconocimiento.

Pero el trabajo de todos no tendría sentido sin usted, el lector, a quien agradecemos el tiempo que dedica a estas páginas y a quien esperamos poder transmitir un mensaje de esperanza en la valorización sostenible de los recurso marinos de todos para todos.

Instituto de Investigaciones Marinas de Vigo · CSIC

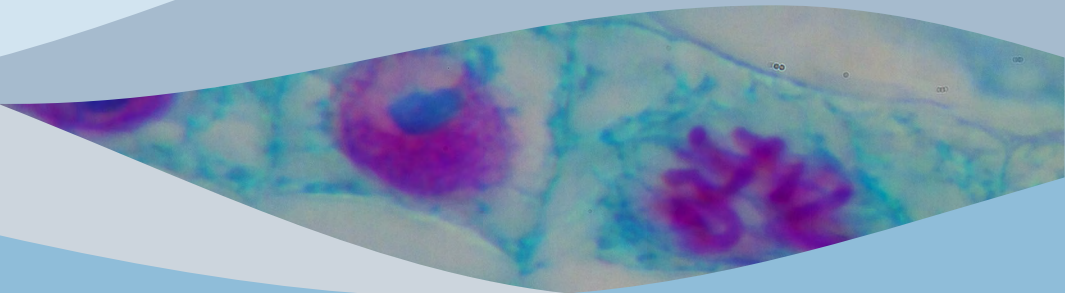
Centro Tecnológico del Mar · Fundación CETMAR

Grupo de Investigación 3B's · Universidad de Minho



Biomateriais em Regeneração de Tecidos

*Biomateriales en
Regeneración de Tejidos*





Biocerámicas obtenidas a partir de diente de tiburón para aplicaciones biomédicas

Estela Balboa F., Cosme Rodríguez V., Estefanía López S.,
Miriam López A., Julia Serra R.*[†], Pío González F.

Grupo Nuevos Materiales, Dpto. Física Aplicada,
Instituto de Investigación Biomédica de Vigo (IBIV),
Campus Lagoas-Marcosende, Universidad de Vigo, 36310, España.
*jserra@uvigo.es

Resumen

Una de las *cerámicas* más ampliamente utilizadas en aplicaciones biomédicas es la hidroxiapatita, un fosfato cálcico con estructura apatítica de gran semejanza a la fase inorgánica del tejido óseo. Aunque puede obtenerse por síntesis química, las fuentes biológicas de hidroxiapatita incorporan propiedades adicionales que promueven procesos biológicos de interés. La posibilidad de revalorizar subproductos o descartes de la pesca para la obtención de productos de alto valor añadido es un área que cobra cada día mayor interés. Es este escenario en el que se centra la temática del presente capítulo, abordando el proceso para la obtención de cerámicas avanzadas a partir de los dientes de tiburón. Un riguroso análisis estructural y composicional muestra las excelentes características físico-químicas del material obtenido.

1. Introducción

Tanto por su importancia nutricional como por su valor económico, el aprovechamiento y valorización de los subproductos pesqueros despierta

cada vez más interés. En la actualidad se encuentra centrada en tres líneas fundamentales: (1) valorización de subproductos para uso alimentario, (2) valorización biotecnológica de subproductos marinos y (3) obtención de compuestos de interés para la industria farmacológica y biomédica (Cecopesca, 2012). Fruto de estas investigaciones y desarrollos, existen en el mercado una serie de productos comerciales: la obtención de harinas y aceites de pescados a partir de las cabezas; la obtención de colágeno, ácidos grasos y ácido hialurónico de las pieles; harinas, aceites y enzimas de las vísceras, o quitosano y carbonato cálcico de los esqueletos.

Aunque todas estas valorizaciones son llamativas, captan interés económico y se sigue investigando en ellas, en los últimos años ha despertado el interés de los investigadores la posibilidad de obtener otro tipo de productos avanzados, entre los que destacan las biocerámicas, como por ejemplo aquellas basadas en carbonatos y fosfatos de calcio con potencial utilidad en la ingeniería de tejidos. Es en esta área donde se centra el tema del presente capítulo, en particular, en el aprovechamiento y valorización de los dientes de tiburón como subproducto de dicha especie.

2. El diente de tiburón como subproducto a valorizar

Los tiburones forman parte de los elasmobranquios o peces cartilaginosos, es decir, sus esqueletos están formados por cartílago en lugar de hueso, siendo el primero más ligero. La tintorera, *Prionace glauca*, es la especie de tiburón pelágica oceánica más común y más ampliamente distribuida, principalmente entre 60°E y 50°S, que se corresponde con el océano Índico. Permanece durante sus primeros años de vida en aguas costeras y neríticas a profundidades de hasta unos 80 m. El marrajo, *Isurus oxyrinchus*, es una especie pelágica (aunque puede habitar por debajo de los 200 m hasta incluso los 500 m de profundidad), tanto costera como oceánica, que se distribuye en latitudes templadas y tropicales; su amplia distribución se debe a su capacidad de conservar metabólicamente el calor. Se captura regularmente por la industria pesquera en el océano Atlántico (Guisande-González y col., 2011).

Situando a España dentro del marco de la pesca, es desde hace una década una de las cinco potencias mundiales y es el país de la Unión Europea que más tiburones pesca, con el 50% de todas las capturas de la zona. Galicia

a su vez, es la principal comunidad pesquera de Europa y al mismo tiempo la región más dependiente de este sector económico. La gran extensión de la costa y de plataforma continental, la presencia de rías y la fuerza de las actividades pesqueras y de acuicultura demuestran claramente la importancia de estos ecosistemas para esta región.

Así, tal y como se observa en la Tabla 1, el puerto de O Berbés en Vigo es uno de los referentes mundiales en descargas de pescado fresco, con más de 70.000 toneladas en 2005 dentro de las cuales 3.000 toneladas anuales corresponden a tiburón. Según las cifras del Puerto de Vigo, la especie de tiburón más descargada en los muelles es la tintorera *Prionace glauca*, que supone el 70% del total, mientras que el marrajo, *Isurus oxyrinchus*, representa el 20%. Por esta razón ambas especies fueron objeto de estudio. Actualmente este puerto exporta la carne de tiburón congelada a los mercados europeos, especialmente a Italia, mediante cargueros, y las aletas, que son muy apreciadas y utilizadas para elaborar la sopa de aleta de tiburón, a Asia (principalmente China y Hong Kong); de hecho, debido a su elevado valor en muchas ocasiones son transportadas por vía aérea.

Tabla 1. Puertos españoles más importantes y toneladas descargadas de pescado fresco en el año 2005 (FAO, 2007)

Puerto del Estado	Tm	Puerto del Estado	Tm
Vigo	74.791	Santander	5.510
Coruña	20.999	Las Palmas	5.263
Cádiz	24.786	Almería	5.065
Avilés	16.497	Marín	4.787
Pasajes	11.448	Tarragona	3.832
Gijón	8.414	Alicante	3.510
Castellón	7.099	Tenerife	3.194

Por tanto, y sabiendo que, de las fuentes consultadas, los dientes de tiburón son descartados y tan sólo comercializados como elementos decorativos, se ha encontrado de especial interés el valorizar este recurso

con aplicación en el campo de la biomedicina y más concretamente dentro de las biocerámicas avanzadas, debido a la similitud tanto estructural como composicional básica de los mismos al compararlos con los dientes de los mamíferos y con el tejido óseo en general.

Así, entrando en detalle en la descripción del tejido dental (Figura 1A), los dientes de los mamíferos, incluyendo los de los seres humanos, son los tejidos más altamente mineralizados, (LeGeros, 1981, Lowenstam y Weiner, 1989, Mann, 2001, Dorozhkin y Epple, 2002) y presentan unas extraordinarias propiedades mecánicas debidas a la disposición de los cristales de hidroxiapatita carbonatada ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) que lo componen (Weiner y Addadi, 1997, Wang y Weiner, 1998, Al-Sawalmih y col., 2008, Fabritius y col., 2009 y Dunlop y col., 2010). El esmalte (en inglés *enamel*) forma la parte exterior y más compacta de los dientes, consta de prismas hexagonales de apatita de tamaños de 100 a 500 nm en una disposición especial con un bajo contenido de matriz orgánica (alrededor de 1% en peso). El interior de los dientes se compone de la dentina, una estructura porosa formada por túbulos dentinarios cuya composición básica es fosfato cálcico carbonatado (Zabler y col., 2007, Marten y col., 2010) con un 20% en peso de matriz orgánica, principalmente colágeno (LeGeros, 1981).

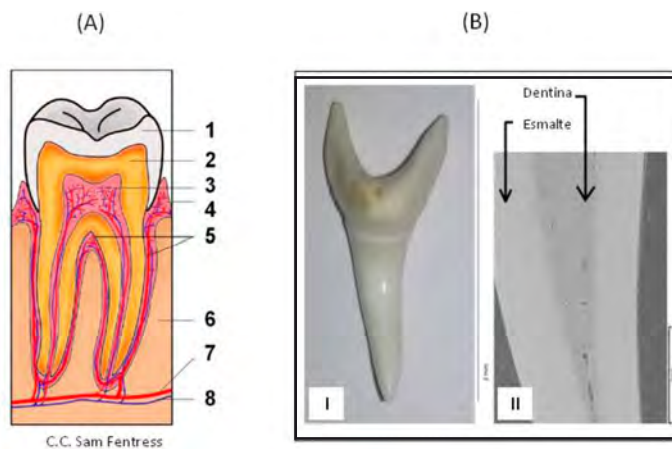


Figura 1. Diagrama general para un diente humano (A: 1-esmalte, 2-dentina, 3-pulpa, 4-encía, 5-tejido conectivo, 6-hueso, 7-vaso sanguíneo, 8-nervio). Diente de tiburón de marrajo, *Isurus oxyrinchus* (B-I) y micrografía SEM en sección longitudinal donde se identifica el esmalte y la dentina del mismo (B-II) (Balboa, 2013).

En el caso del tiburón, la parte exterior de los dientes se denota como pseudo-esmalte o *enameloid* debido a que se encuentra hipermineralizado

y presenta una gran dureza, al compararlo con el esmalte de los dientes de los mamíferos (Herold y col., 1980, Kemp, 1984). En el interior de los dientes se encuentra también la dentina que es más blanda y menos mineralizada que el pseudo-esmalte (Figura 1B). Finalmente es sabido (Wei y col., 2011) que los dientes de tiburón contienen, además de hidroxiapatita, otra biocerámica, la fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)\text{F}$), como fase biomineral con sustituciones parciales de fosfato por carbonato y de fluoruro por hidróxido.

3. El tejido óseo y las biocerámicas

El tejido óseo de los vertebrados es un material híbrido formado por una fase mineral (70% de su peso), matriz orgánica (24%) y agua (el restante 6%). La fase mineral es un material cerámico compuesto de alta dureza y bajo peso, formado mayoritariamente por fosfatos de calcio estructurados químicamente en forma de hidroxiapatita carbonatada de baja cristalinidad, y con un 10% de deficiencia de calcio. Su estructura cristalizada en prismas hexagonales de tamaño nanométrico y su composición deficiente en calcio, favorecen su alto nivel de solubilidad, lo que promueve una regeneración ósea constante por medio de una continua disolución y de ciclos de cristalización (Estrada y col., 2006).

Mineralógicamente hablando, la hidroxiapatita carbonatada (HA) es un fosfato cálcico perteneciente al grupo de las apatitas con presencia de iones hidróxido, de fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. La composición de la hidroxiapatita mineral estequiométrica posee una relación Ca/P de valor 1'67, mientras que la de la hidroxiapatita deficiente en calcio, $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$, es de 1'5 siendo esta última la más parecida a la presente en los huesos humanos. Ambas apatitas pueden presentar sustituciones isomórficas en su estructura: del grupo PO_4^{-3} por iones CO_3^{-2} , SO_4^{-2} , $\text{CO}_3\text{OH}^{-3}$, CO_3F^{-3} , etc.; del catión Ca^{+2} por Mg^{+2} , Pb^{+2} , Zn^{+2} , K^+ , etc.; y del anión OH^- por F^- , Cl^- , etc.

La hidroxiapatita se puede obtener de forma sintética por diferentes procesos físico-químicos y se encuentran disponibles comercialmente tanto en forma porosa como densa, en forma granulada o en bloque, y con diferentes tamaños de poro (Vallet-Regí y Ruiz-Hernández, 2011, Salinas y col., 2013, Castañeda-Martín, 2004). No obstante, la fuente de apatitas biológicas de uso clínico más extendida hoy en día es el hueso bovino como injerto para varios tipos de defectos óseos y con resultados satisfactorios.

La primera aplicación de este producto como un material de sustitución ósea proviene de la década de los 50, a partir de ese momento le siguieron décadas de investigación hasta obtener los materiales comerciales exentos de inmunogenidad. Para ello el hueso bovino se sometía a procesos pirolíticos con el objeto de eliminar todas las proteínas y elementos celulares que normalmente ocupan los espacios inter-trabeculares del mismo, logrando así una matriz muy similar a la matriz ósea humana (Wenz y col., 2001).

En la búsqueda de otras fuentes naturales de fosfatos cálcicos porosos se han investigado diferentes organismos del medio marino. Uno de ellos es la hidroxiapatita porosa obtenida a partir de coral *Porites goniopora*, ya que su exoesqueleto está compuesto de carbonato cálcico en forma de canales paralelos interconectados por microporos. Este carbonato cálcico se transforma por un proceso de conversión hidrotermal en hidroxiapatita, es decir, en ciertas condiciones acuosas y de temperatura ya optimizadas favoreciendo el intercambio químico con fosfatos. En este proceso se conserva la estructura del coral, mientras que la composición de la fase cambia debido a la disolución localizada y a la recristalización. Otra de las fuentes marinas sobre las que se ha estudiado esta conversión hidrotermal son las espinas o púas de erizo de mar *Heterocentrotus mammillatus*. El mayor inconveniente de estas fuentes es la consideración como especies protegidas en muchos países, lo que limita su explotación a nivel industrial.

Actualmente existe un interés creciente en abordar la obtención de estas biocerámicas a partir del aprovechamiento de subproductos o descartes pesqueros. Las espinas de pescado y los caparazones de crustáceos son, entre otros, actualmente investigados para tal fin. En nuestro caso hemos fijado nuestro interés en otro subproducto como es el diente del tiburón.

4. Biocerámicas a partir de diente de tiburón

4.1. Proceso de obtención

Como ya se mencionó anteriormente, las dos especies de tiburón más descargadas en muelles vigueses son el marrajo *Isurus oxyrinchus* y la tintorera o tiburón azul *Prionace glauca*, por esta razón fueron estudiadas como fuente de material para su valorización. Durante el despiece del tiburón, la cabeza es desechada, incluyendo los dientes en la mandíbula

del animal. Para poder procesar los dientes de tiburón, la primera fase consiste en eliminar restos orgánicos de la mandíbula que envuelven la raíz de los mismos (Figura 2). Esto se lleva a cabo mediante cocción en agua durante 6 horas, permitiendo así que se suelten de la misma. Se recogen y se lavan bien con agua limpia retirando cualquier tejido blando que pudiera seguir adherido y se secan en una estufa de laboratorio.



Figura 2. Esquema ilustrativo del proceso de obtención del diente de tiburón como recurso pesquero a valorizar (Balboa, 2013).

Una vez que los dientes de tiburón fueron limpiados, se procede a su molienda, la cual es realizada mediante un molino mezclador de bolas (de carburo de tungsteno de 7 mm de diámetro) de la casa Retsch, modelo MM2000, a una frecuencia de oscilación comprendida entre 3 y 35 Hz (180-1500 r.p.m.), durante 4-5 minutos; posteriormente se separa por rangos de tamaño de partícula, tamizando entre 4 mm, 1 mm, 0'063 mm y 0'02 mm. Una vez tamizado, el material es sometido a un proceso de pirolización con el objeto de eliminar toda la materia orgánica presente en el mismo. En la Figura 3 se esquematiza dicho proceso. Así, se realizó un estudio sistemático variando la temperatura de pirolización y caracterizando el material obtenido en cada una de las temperaturas con el objeto de controlar la pérdida de peso de la muestra, densidad y composición. Se establecieron ensayos con rampas de ascenso y descenso de temperatura a velocidad y tiempo constante. En particular hemos variado la temperatura

de pirolización desde 100 °C hasta 950 °C, manteniendo los siguientes parámetros: rampa de ascenso de temperatura (2 °C/min), tiempo de permanencia a la temperatura del experimento (720 min), rampa de descenso de temperatura (20 °C/min).

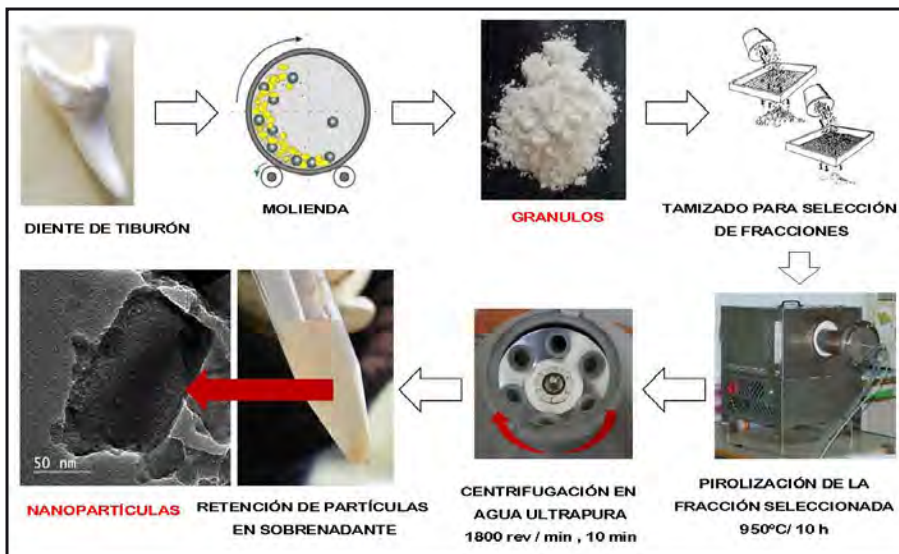


Figura 3. Esquema ilustrativo del proceso de valorización seguido para la obtención de biocerámicas a partir de dientes de tiburón (Balboa, 2013).

4.2. Análisis físico-químico

En primer lugar presentaremos la caracterización físico-química correspondiente al subproducto pesquero a valorizar, el diente de tiburón. Seguidamente abordaremos el análisis del material después de ser sometido al proceso de valorización para la obtención de la biocerámica. Las técnicas de análisis empleadas fueron: microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis de rayos-x por dispersión de energías (EDS), espectroscopía infrarroja (FTIR), Raman (FTRAMAN), difracción de rayos X (XRD), ICP-OES, fluorescencia de rayos X, cromatografía de fluoruros, espectroscopía de fotoelectrones de rayos x (XPS) y espectrometría de iones secundarios por tiempo de vuelo (TOF-SIMS). Así, también fueron empleados ensayos biomecánicos y micrografía computerizada, para conocer parámetros estructurales como resistencia a la compresión, dureza y grado de porosidad del material.

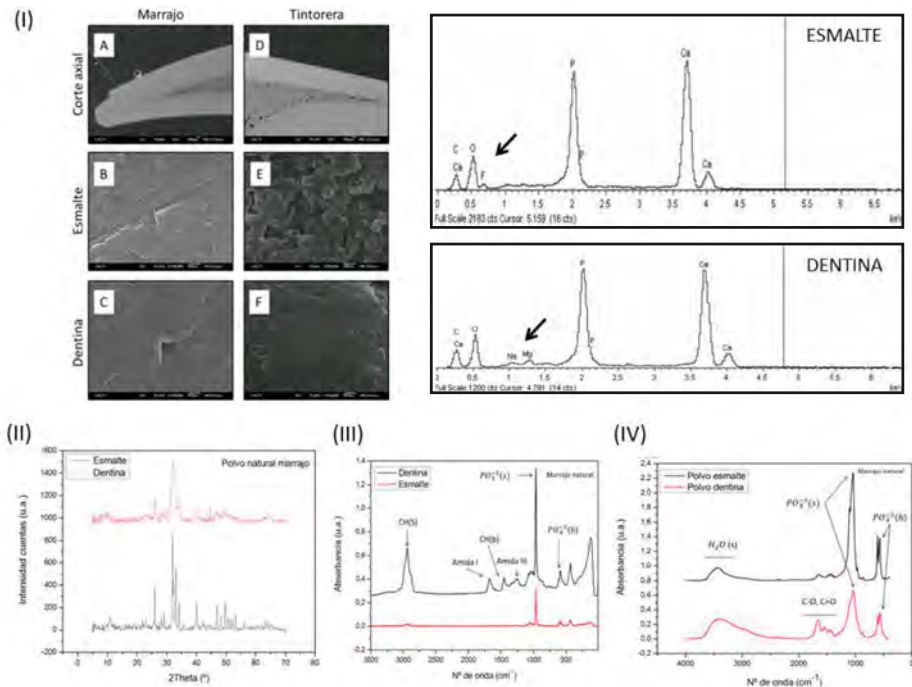


Figura 4. (I) Micrografías SEM y análisis EDS, (II) difractogramas de rayos-X, (III) espectros RAMAN y (IV) espectros FTIR, tanto para el esmalte como la dentina de diente de tiburón (Balboa, 2013).

A. Estudio del material natural

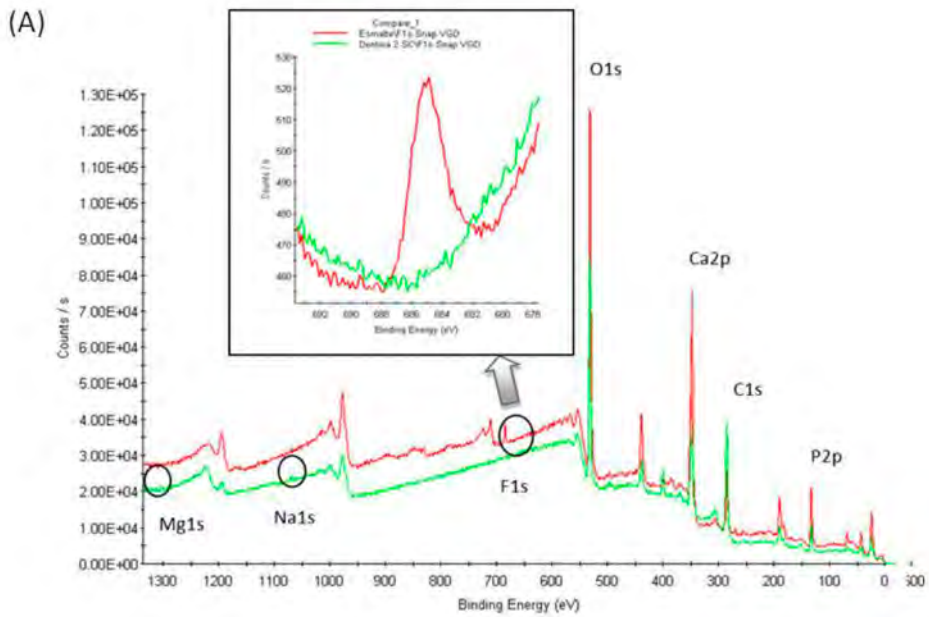
Se realizaron cortes transversales y longitudinales del diente natural para disponer de piezas que nos permitieran tanto el análisis del esmalte como de la dentina. En la Figura 4I se presentan micrografías SEM de diente de marrajo y tintorera de las diferentes zonas en corte axial (A, D), en detalle del esmalte (B, E) y de la dentina (C, F). Se observa la diferencia morfológica entre el esmalte y la dentina, siendo ésta última más porosa, para ambas especies. Al analizar el esmalte se aprecian más claramente estructuras cristalinas (B, E) apiladas de forma longitudinal, mientras que en el caso de la dentina se aprecia una estructura trabecular porosa (C, F). Así mismo, los análisis EDS muestran claramente como el esmalte presentan flúor en su composición (además del esperado calcio y fósforo) mientras que en la dentina no está presente mientras sí lo hace el magnesio y el sodio, muestra de las sustituciones que pueda estar presentando la HA que forma estos tejidos. Desde el punto de vista estructural, los análisis XRD (Figura 4II) muestran como ambas partes, esmalte y dentina, presentan

estructura cristalina, estando los picos de difracción mejor definidos y con un menor ancho de banda a media altura (FWHM) en el caso del esmalte. En esta línea, los análisis RAMAN de grupos funcionales en el infrarrojo (figura 4III) muestran como la dentina presenta bandas a números de onda asociados en la literatura a los compuestos orgánicos (amida I y III), siendo mucho más débiles en el esmalte. Por el contrario, los grupos funcionales del fosfato (Figura 4III y 4IV) son mucho más intensos y bien definidos en el esmalte que en la dentina. Estos resultados, por otra parte esperables, muestran el alto contenido de materia orgánica presente en la dentina en comparación con el esmalte (Asefnejad y col., 2011), lo cual es importante tener en cuenta de cara al proceso de obtención de la biocerámica final.

Con el objeto de profundizar en el análisis elemental del diente de tiburón y teniendo en cuenta lo antes comentado (la parte más exterior *enameloid* se encuentra hipermineralizada), se procedió a la caracterización de la superficie del mismo mediante la técnica XPS. A modo de ejemplo, en la Figura 5A se muestran los espectros tanto para la dentina (color verde) como para el esmalte (color rojo). Ambos espectros son muy similares, pudiéndose identificar la presencia de los elementos químicos propios de un fosfato cálcico: Ca, P y O. No obstante, podemos detectar ligeras diferencias: en la región del esmalte se aprecia la presencia de flúor que en el caso de la dentina no por aparece; al mismo tiempo son visibles pequeñas contribuciones de Na y Mg en la dentina que en el esmalte no son detectadas. Estos resultados refuerzan los mostrados anteriormente. Así mismo, en la zona de la dentina existe una concentración mayor de carbono, mostrando esa mayor presencia de material orgánico que ya fue determinada en anteriores caracterizaciones. Con el fin de cuantificar las diferentes contribuciones, se realizó la correspondiente valoración de la intensidad de las diferentes señales y se encontró la composición atómica elemental: la región del esmalte analizado presenta una proporción aproximada del 2% atómico de flúor mientras que en la dentina no está presente.

En esta misma línea, se procedió a analizar el material mediante la técnica TOF-SIMS (Figura 5B), presentando los resultados como una combinación de imágenes o mapas. Los espectros de masas en TOF-SIMS, aún en el caso de materiales inorgánicos, son complejos ya que el espectro está compuesto por miles de iones. Tras la interpretación hemos podido comprobar la existencia de una finísima capa externa de esmalte con un

alto contenido de fluor, representada en color naranja, seguida de otra zona más amplia también de esmalte pero con menos concentración de flúor y finalmente la dentina en color verde. Esta capa más externa y más enriquecida en flúor ya había sido detectada en las micrografías SEM.



Muestra	C	O	Ca	P	F	Na	Mg	Fe
Esmalte	18.49	46.07	16.81	14.38	2.17	-	-	2.08
Dentina	50.36	31.56	8.29	8.34	-	0.70	0.75	-

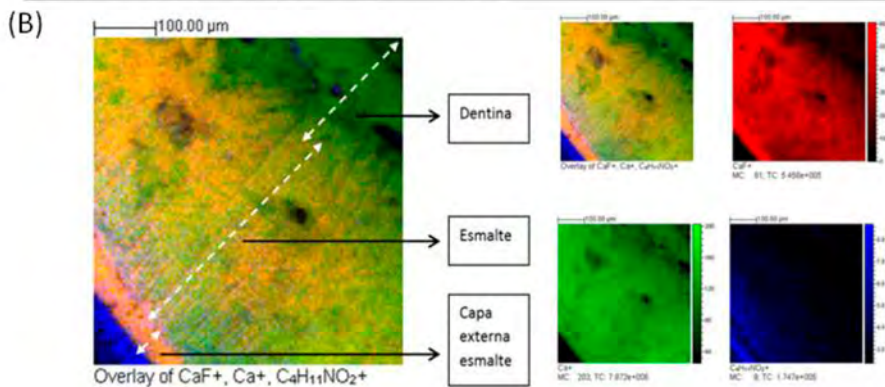


Figura 5. (A) Espectro XPS y (B) superposición de mapa químico TQF-SIMS para diente de tiburón (Balboa, 2013).

Por último, con la finalidad de investigar el grado de porosidad de los materiales y además conocer sus propiedades estructurales tales como resistencia y módulo de Young, hemos empleado la técnica de Micro-Tomografía Computerizada (μ -CT) y ensayo mecánico. En la Figura 6, se muestran las imágenes de μ -CT tanto para el diente completo como para zonas específicas del mismo, donde se destacan los poros interconectados de la estructura trabecular en color azul. En cuanto a la porosidad del diente completo, el volumen total de poros es de alrededor de un 6%, encontrándose mayoritariamente concentrada en la dentina. Esta porosidad se encuentra especialmente distribuida en la zona hacia la raíz, disminuyendo a medida que nos acercamos al extremo del diente, siendo nula para el esmalte. Así mismo se procedió a extraer un cilindro de la dentina y someterlo a ensayo mecánico. De dicho análisis se obtuvieron valores de resistencia a la compresión similares a los del tejido óseo humano.

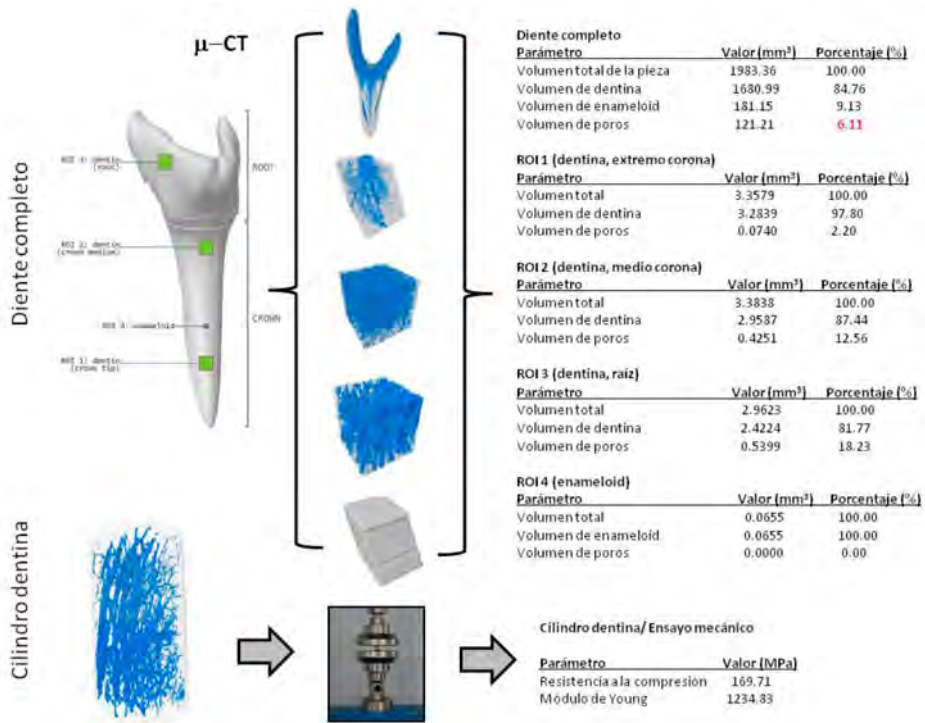


Figura 6. Análisis μ -CT y ensayo mecánico para diente de tiburón (Balboa, 2013).

B. Estudio de la biocerámica obtenida

Tal como hemos detallado en el apartado 3.1, el proceso de valorización del subproducto tiene como paso fundamental la pirolización del material con el objeto de retirar la materia orgánica del mismo, y en esa medida quedarnos únicamente con la parte mineral del diente de tiburón. Para garantizar el control de este proceso y localizar la temperatura óptima para lograr dicho objetivo, se procedió a un estudio de pérdida de peso en función de la temperatura aplicada. Se sometieron muestras de dentina de marrajo a diversas temperaturas (100, 200, 400, 500, 550, 600, 700 y 900 °C) durante 12 horas (720 minutos) con rampas de calentamiento y enfriamiento fijas. Se pesaron las muestras antes y después de la pirólisis para cada una de las temperaturas y calculando, mediante resta simple, la pérdida de masa (materia orgánica y agua) debida a la descomposición térmica. En la Figura 7A se representa en el eje de ordenadas los porcentajes de pérdida y en abscisas la temperatura de pirólisis, quedando muy clara la tendencia lineal y que la mayor pérdida de masa se produce a partir de 500 °C. A continuación se hicieron nuevamente pero ya incluyendo en los experimentos el esmalte y polvo mezclado de esmalte y dentina. Se incrementó la temperatura máxima para asegurar la retirada total de materia orgánica de las muestras, ya que en el caso del esmalte a 900 °C todavía se apreciaba cierta coloración negra en la punta de la pieza que indica la presencia de materia orgánica, coloración que desaparece a 950 °C. En la Figura 7B se presentan las imágenes de las muestras tras la pirólisis a las distintas temperaturas. Para la mezcla de esmalte y dentina en polvo ya se aplicó directamente la temperatura de 950 °C. Esta temperatura se ha tomado como la óptima para el procesamiento de la biocerámica.

A continuación, en la Figura 7C, se muestran micrografías SEM del diente natural y pirolizado para diferentes magnificaciones, diferenciando entre dentina y esmalte. Se observa cómo la porosidad aumenta considerablemente con respecto a la de la pieza sin pirolizar, debido a la eliminación de la materia orgánica por el efecto de la temperatura. Además parece ocurrir un proceso de suavizado de los bordes de los cristales que forman ambos materiales.

Al igual que para las piezas naturales, para todas las muestras pirolizadas se procedió a realizar el mismo análisis sistemático por FTIR y RAMAN con el objetivo de evaluar y caracterizar los cambios en la composición de las muestras como consecuencia de la pirólisis a distintas temperaturas. A modo de ejemplo en la Figura 7D se presenta el análisis FTIR realizado al polvo natural, pirolizado y sinterizado procedente de diente de tintorera,

revelando la desaparición de las bandas asociadas a la parte orgánica y manteniéndose las bandas de los grupos fosfatos. El análisis detallado de los espectros nos permite la siguiente asignación:

- En el espectro para el material natural se detectan bandas correspondientes al grupo fosfato (PO_4^{-3}) a 1096, 1032, 964, 604 y 564 cm^{-1} y grupo carbonato (CO_3^{-2}) a 872, 1420 y 1460 cm^{-1} . Tenemos también la materia orgánica que se aprecia en las bandas correspondientes a enlaces C-H (2876 - 2963 cm^{-1}) y N-H (3098, 1557 cm^{-1}), también amida I (1600 - 1680 cm^{-1}) que son los enlaces C-O, C=O y amida III (1200 - 1400 cm^{-1}).
- En el espectro del material pirolizado a 950 °C y sinterizado, observamos la desaparición de los grupos asociados a la parte orgánica, mientras los grupos asociados a la parte mineral (PO_4^{-3}) siguen estando presentes o incluso mejor definidos. Las bandas de 3553 cm^{-1} correspondientes al grupo OH⁻ están más atenuadas que en el material natural. De todas formas es importante aclarar que la presencia de estos grupos puede deberse a la propia preparación de la muestra con pastilla de KBr que absorbe agua, ya que las temperaturas de pirolizado aseguran la eliminación completa del agua de las muestras.

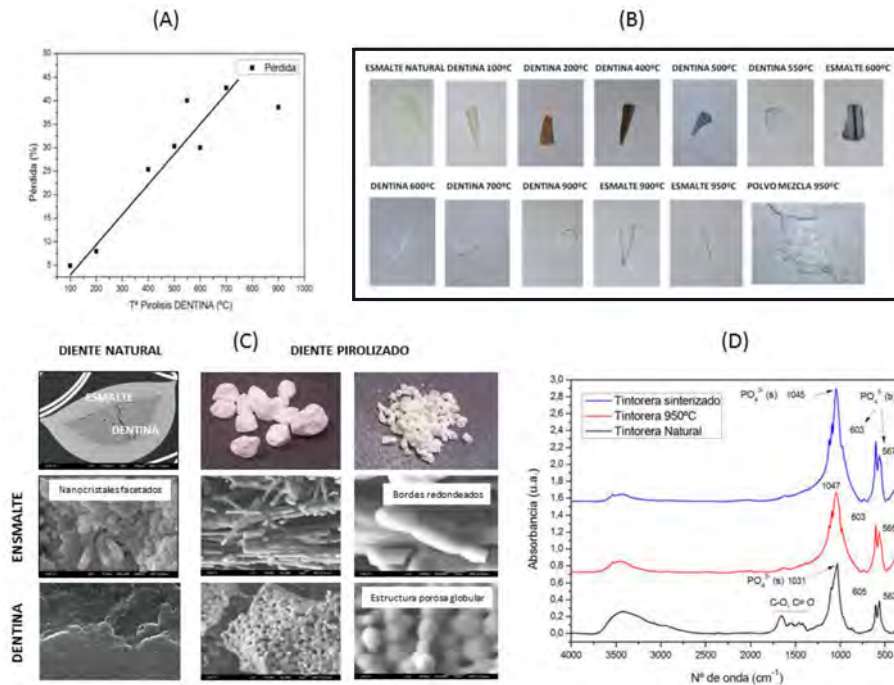


Figura 7. (A) Representación del porcentaje de pérdida de masa en dentina en función de la temperatura de pirólisis, (B) imágenes de diferentes piezas después de la pirólisis, (C) micrografías SEM, y (D) espectros FTIR antes y después de la pirólisis (Balboa, 2013).

Desde el punto de vista estructural, el análisis XRD y la difracción de electrones en microscopía TEM son unas de las técnicas más ampliamente utilizadas y que permiten identificar las distintas fases minerales que componen al material analizado. A modo de ejemplo, en la Figura 8A se muestran los difractogramas para el esmalte antes y después del proceso de pirólisis. Podemos observar como el calentamiento a 950 °C da lugar a un espectro con picos más definidos como consecuencia de la retirada de la parte orgánica del mismo. En la Figura 8B se muestran imágenes TEM y los patrones de difracción de electrones de esmalte natural y pirolizado. Ambos análisis confirman que la biocerámica obtenida del esmalte de diente de tiburón es una fluorapatita, como el material de partida, con una contribución muy reducida de una segunda estructura cristalina identificada como whitlockita, que se origina como consecuencia de posibles reacciones químicas del esmalte y restos de dentina (no retirada por el proceso mecánico utilizado) a estas altas temperaturas. Ambas estructuras son de interés biomédico. En el caso de

pirolizar el diente completo, el resultado es una biocerámica compuesta de diferentes estructuras cristalinas de base fosfato cálcico con especial presencia de hidroxiapatita carbonatada, fluorapatita y whitlockita.

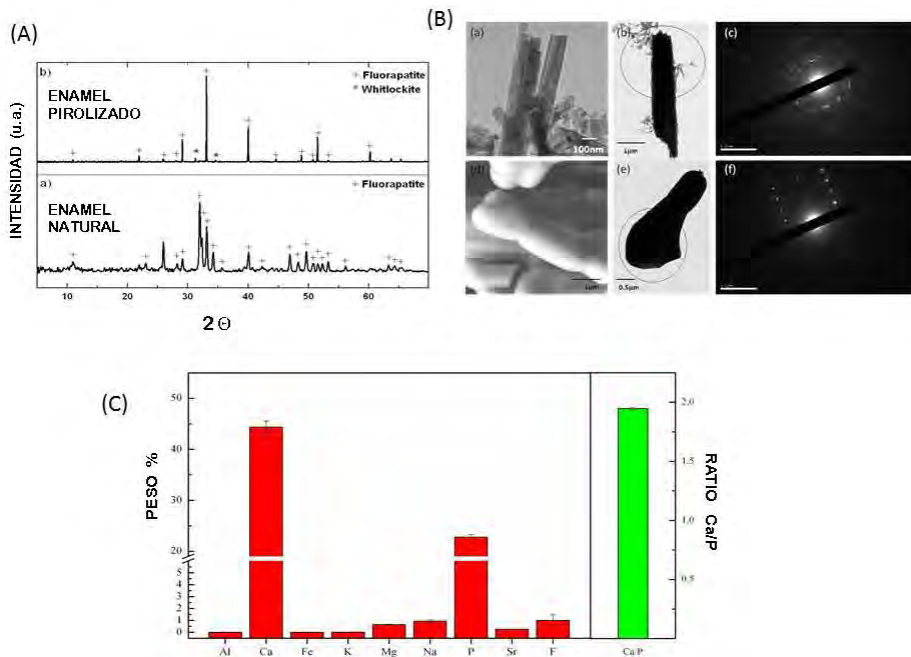


Figura 8. (A) Difractogramas de rayos X e identificación de estructuras y (B) micrografías TEM con patrones de difracción de electrones para el esmalte natural y pirolizado a 950 °C. (C) Composición química determinada por fluorescencia de rayos X de la biocerámica obtenida tras la valorización del diente de tiburón (Balboa, 2013).

Para finalizar la caracterización físico-química de esta novedosa biocerámica, hemos abordado el análisis composicional mediante ICP-OES y cromatografía de fluoruros, técnicas que nos permitieron determinar el contenido de P, Sr, Ca, Na, Mg y F. Para ello se procedió al ataque con ácido nítrico y peróxido de hidrógeno dentro de un digestor de teflón en horno microondas. La muestra analizada correspondió a polvo mezcla de dentina y esmalte pirolizados a 950 °C. Confirmando los resultados de las técnicas de análisis que anteriormente fueron expuestos, se observa cómo la mayor parte de la composición está formada por el calcio y el fósforo, estando presentes los elementos F, Na, Mg, Sr y K, todos ellos de interés biológico.

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran la viabilidad de la metodología empleada para la obtención de fosfatos cálcicos de estructura apatítica a partir de diente de tiburón, concretamente marrajo (*Isurus oxyrinchus*) y tintorera (*Prionace glauca*), como una valorización de un subproducto pesquero.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al personal del CACTI (Centro de Apoyo Científico e Tecnológico á Investigación, Universidade de Vigo) por la asistencia técnica, y a las entidades que han financiado parcialmente esta investigación: UE-POCTEP 0330IBEROMARE1P project, UE-INTERREG 2011-1/164MARMED project, Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2010-18281), Xunta de Galicia (GRC2013-008), Fundación Mutua Madrileña Project 2013, Universidade de Vigo 13VI05. M. López-Álvarez agradece la financiación de FP7/REGPOT-2012-2013.1 (Nº 316265, BIOCAPS).

Referencias bibliográficas

- Al-Sawalmih A., Li C. H., Siegel S., Fabritius H., Yi S. B. y col. (2008) Microtexture and chitin/calcite orientation relationship in the mineralized exoskeleton of the American lobster. *Advanced Functional Materials*, 18: 3307–3314.
- Asefnejad A., Behnamgader A., Khorasani M. T., Farsadzadeh B. (2011) Polyurethane/ fluor-hydroxyapatite nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Part I: morphological, physical, and mechanical characterization. *International Journal of Nanomedicine*, 6: 93-100.
- Balboa F. E. (2013) Valorización de recursos naturales en la producción de materiales cerámicos con aplicaciones biomédicas. Proyecto Fin de Carrera. Escuela Técnica Superior de Ingeniería de Minas de Vigo. Departamento de Física Aplicada. Universidade de Vigo. 183p.
- Castañeda-Martín, E. (2004) Biomateriales de naturaleza inorgánica: metales, aleaciones y cerámicas. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 11, 28004 Madrid. España, (2013). Web 2.0.
- Cecopesca. (2012) Guía para el aprovechamiento de los subproductos de pescado para la obtención de productos funcionales y bioactivos. Centro Técnico de Conservación de Productos de la Pesca y la Acuicultura, Madrid.
- Dorozhkin S. V., Epple, M. (2002) Biological and medical significance of calcium phosphates. *Angewandte Chemie International Edition*. 41 (17): 3130–3146.

- Dunlop J. W. C., Fratzl P. (2010) Biological composites. *Annual Review of Materials Research*, 40: 1–24.
- Estrada C., Paz A. C., López L. E. (2006) Ingeniería de tejido óseo: consideraciones básicas. *Escuela de Ingeniería de Antioquia*, 5: 93-100.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) (2007) FID/CP/ESP Abril 2007. <http://www.fao.org/>
- Fabritius H., Sachs C., Triguero P., Raabe D. (2009) Influence of structural principles on the mechanics of a biological fiber-based composite material with hierarchical organization: the exoskeleton of the lobster *Homarus americanus*, *Advanced Materials*, 21: 391–400.
- Guisande-González C., Pascual-Alayón P. J., Baro-Domínguez J., Granado-Lorencio C., Acuña-Couñago A. y col. (2011) Tiburones, rayas, quimeras, lampreas y mixínidos de la Costa Atlántica de la Península Ibérica y Canarias. Ediciones Díaz de Santos.
- Herold R. C., Graver H. T., Christner P. (1980) Immunohistochemical localization of amelogenins in enameloid of lower vertebrate teeth. *Science*, 207: 1357–1358.
- Kemp N. E. (1984) Organic matrices and mineral crystallites in vertebrate scales, teeth and skeletons, *American Zoologist*, 24: 965–976.
- Le Geros R. Z. (1981) Apatites in biological systems. *Progress in Crystal Growth Characteristics*, 4: 1–45.
- Mann S. (2001) *Biom mineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford University Press, Oxford. 198 p.
- Marten A., Fratzl P., Paris O., Zaslansky P. (2010) On the mineral in collagen of human crown dentine. *Biomaterials*, 31: 5479–5490.
- Salinas J. A., Esbrit P., Vallet-Regí M. (2013) A tissue engineering approach based on the use of bioceramics for bone repair. *Biomaterials Science*, 40-51.
- Vallet-Regí M., Ruiz-Hernández E. (2011) Bioceramics: from bone regeneration to cancer nanomedicine. *Advanced Materials*, 23: 5177–5218.
- Wang R., Weiner S. (1998) Human root dentin: structural anisotropy and Vickers microhardness isotropy. *Connective Tissue Research*, 39: 269–279.
- Wei S., Wei J., Liu X., Wang C., Zhang Y. (2011) WIPO Patent No. 2011160265. Geneva, Switzerland: World Intellectual Property Organization.
- Weiner S., Addadi L. (1997) Design strategies in mineralized biological materials. *Journal of Materials Chemistry*, 7: 689–702.
- Wenz B., Oesch B., Horst M. (2001) Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*, 22 (12): 1599–1606.
- Zabler S., Cloetens P., Zaslansky P. (2007) Fresnel-propagated submicrometer X-ray imaging of water-immersed tooth dentin. *Optics Letters*, 32: 2987–2989.

Recubrimientos cerámicos multisustituidos de origen marino

Estefanía López S., Cosme Rodríguez V., Miriam López A., Julia Serra, Pío González*

Grupo Nuevos Materiales, Dpto. Física Aplicada,
Instituto de Investigación Biomédica de Vigo (IBIV),
Campus Lagoas-Marcosende, Universidad de Vigo, 36310, España.
*pglez@uvigo.es

Resumen

Una de las estrategias actuales para la mejora de la osteointegración en implantes metálicos empleados en cirugía ortopédica y maxilofacial es la utilización de recubrimientos biocerámicos. Por otra parte existe una creciente demanda de nuevas fuentes de apatitas biológicas para aplicaciones en regeneración ósea. En el presente capítulo se aborda la biocompatibilidad de recubrimientos biocerámicos procesados mediante tecnología láser PLD utilizando como fuente biológica apatitas de dientes de tiburón. Por otra parte, mediante una perspectiva biomimética, se han incorporado cantidades traza de elementos esenciales en apatitas sintéticas para imitar la composición biológica del hueso y mejorar la funcionalidad de los recubrimientos. Los elementos testados han sido silicio (obtenido de tierra de diatomeas), estroncio y selenio.

1. Introducción

En la actualidad las estrategias empleadas en cirugía ortopédica y maxilofacial se enfocan, principalmente, hacia la reparación o reemplazo del tejido dañado, y también, en una vertiente más innovadora, hacia la regeneración del mismo. Uno de los materiales que más se utiliza es el titanio, y sus aleaciones, debido en gran medida a sus excelentes propiedades mecánicas. Sin embargo, cuando estos materiales metálicos

son implantados surgen numerosos problemas como la unión insuficiente entre el material y el tejido circundante, la existencia de diferentes propiedades mecánicas entre el hueso y el material, que conduce a estrés, y la muerte celular provocada por los restos generados en la superficie articular de los propios implantes ortopédicos (Tran y Webster, 2008).

El uso de biomateriales a modo de recubrimientos cerámicos sobre estas aleaciones metálicas es una de las estrategias investigadas para solucionar los mencionados problemas y mejorar la osteointegración del implante y la respuesta en el organismo. Además, como ya se ha comprobado en numerosos estudios, la biocompatibilidad de estos recubrimientos está íntimamente relacionada con el comportamiento de las células que están en contacto con ellos de forma que, en este sentido, las características superficiales del recubrimiento, topografía y energía química o superficial, juegan un papel muy importante en la adhesión y posterior proliferación de las células sobre el material (Rodríguez-Valencia y col., 2013, Anselme, 2000).

Entrando en detalle, la aplicación de apatitas en dichos recubrimientos cerámicos, especialmente hidroxiapatita (HA), es de gran interés dada la similitud en composición con la parte mineral del tejido óseo humano, por ser ventajosa para mejorar la formación de hueso alrededor del implante y contribuir a la fijación del mismo, mejorando así el éxito clínico en una etapa temprana después de la implantación. Además, tal y como se ha comprobado recientemente, la mejora en la osteointegración de los implantes metálicos recubiertos con hidroxiapatita se debe al resultado directo de las reacciones superficiales que ocurren en el propio recubrimiento tales como la disolución y precipitación del mismo, el intercambio iónico acompañado de la absorción e incorporación de moléculas biológicas, la unión, proliferación y diferenciación celular y, finalmente, la estimulación para la formación y mineralización de la matriz extracelular Narayanan y col., 2008).

En la actualidad, en la práctica clínica, se utilizan como fuentes de hidroxiapatita básicamente aquellas de origen sintético o bovino. En el caso de la de origen sintético a pesar de ser ampliamente utilizada se ha comprobado que su funcionalidad es limitada reduciéndose, básicamente, a producir un efecto tensor disminuyendo el volumen del defecto. Esto implica un menor grado de osteoconductividad y reducción de las

propiedades mecánicas. Por otro lado, la derivada de fuentes biológicas, como es el caso del hueso bovino, se ha utilizado con éxito hasta hoy en día ya que incorpora propiedades bioactivas una vez implantada estimulando la funcionalidad del tejido óseo circundante; sin embargo, existe una cierta controversia respecto a su uso debido a los potenciales (aunque ínfimos) riesgos en cuanto a transmisión de enfermedades y ciertos conflictos culturales.

En la búsqueda de nuevas fuentes biológicas de hidroxiapatita, trabajos recientes del grupo de investigación Nuevos Materiales de la Universidad de Vigo han demostrado la viabilidad y enorme potencialidad a nivel comercial de apatitas de origen marino a partir de dientes de tiburón, ya que éstos presentan una estructura y composición similares a los dientes de los mamíferos y al tejido óseo en general. Además como se ha detallado en el capítulo previo, la diferencia composicional más relevante, que reside en que el esmalte del diente de tiburón se encuentra hipermineralizado y contiene además de la hidroxiapatita como fase biomineral otra apatita llamada fluorapatita ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_2\text{F}$), supone una ventaja considerable dando lugar a un material con un mayor módulo elástico y mayor dureza que la hidroxiapatita. Finalmente, también se ha comprobado recientemente que la incorporación de iones fluoruro a la red cristalina de la apatita protege al diente del ambiente ácido responsable de la formación de caries dental (Enax y col., 2012).

2. Obtención de recubrimientos biocerámicos. Método de procesamiento

Existen diferentes métodos en la producción de recubrimientos cerámicos que pueden ser clasificados en distintas categorías tales como procesos en húmedo, electroquímicos o de alta temperatura y, dentro de estos últimos, los basados en técnicas láser son los que más se están investigando en la actualidad. Uno de estos métodos es el llamado depósito por láser pulsado – *Pulsed laser deposition, PLD* (Narayan y col., 2008).

De forma general y a modo descriptivo, para la producción de un recubrimiento mediante PLD, la primera fase consiste en la fabricación de una pastilla con polvo prensado de la composición biocerámica de interés que constituirá el blanco de ablación. A continuación, esta pastilla es

irradiada mediante un haz laser, lo cual provoca su evaporación, formándose un plasma en forma de pluma de ablación que incidirá sobre el sustrato metálico que se quiere recubrir (Figura 1). Es importante aclarar que este proceso se lleva a cabo en el interior de una cámara de vacío y bajo el preciso control de los parámetros de presión, temperatura y energía láser. Esta técnica ofrece claras ventajas, comparándola por ejemplo con plasma spray (Solla y col., 2007), como la ausencia de contaminación debido al empleo del haz de láser bajo condiciones de vacío, materiales crecientes con un punto de fusión alto y una buena transferencia estequiométrica de la composición del blanco. Además, permite variar parámetros de procesamiento y obtener así recubrimientos a la carta con un espesor, morfología y composición controlada, incluyendo una capa delgada con apenas unos nanómetros de espesor, lo que asegura una mayor adhesión del recubrimiento y estabilidad del mismo una vez implantado.

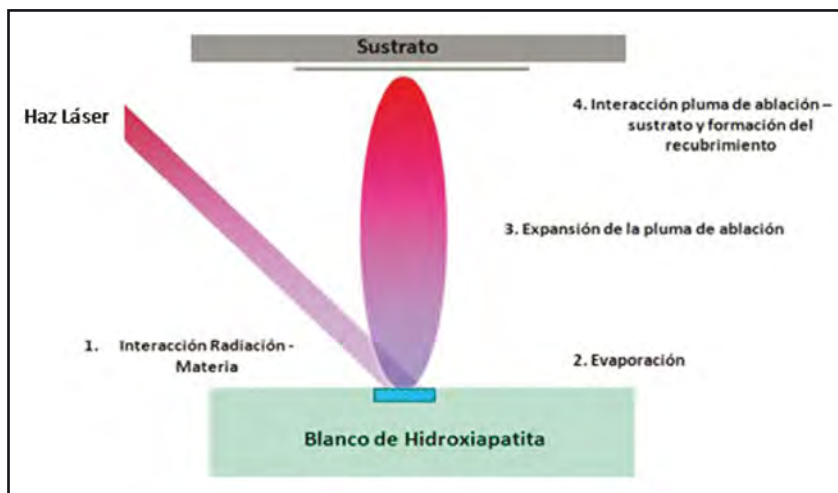


Figura 1. Esquema donde se detalla la producción de recubrimientos mediante Depósito por Láser Pulsado (PLD).

3. Recubrimientos biocerámicos de origen marino. Diente de tiburón

Utilizando como fuente, para la obtención del blanco de ablación, biocerámicas obtenidas a partir de la pirólisis del diente de tiburón, en concreto en el presente capítulo de la especie *Prionace glauca* (siguiendo la metodología detallada en el capítulo anterior) se procesaron mediante PLD recubrimientos de apatita de origen marino sobre discos de aleación de titanio grado médico.

Tras su obtención y su caracterización fisicoquímica, se procedió a valorar su biocompatibilidad al contacto directo con pre-osteoblastos de cráneo de ratón de la línea celular MC3T3-E1 (Figura 2). Para ello se ha evaluado la actividad metabólica (proporcional a la viabilidad celular) de las células testadas sobre dichos recubrimientos (denominados en la gráfica ST) y utilizando como control recubrimientos de hidroxiapatita de origen sintético (HAc) y el llamado "gold standard" utilizado para el control de estado saludable del cultivo celular, *Tissue Culture Polystyrene* (TCP). Tal y como se pudo observar, los resultados obtenidos demostraron el comportamiento claramente biocompatible de los recubrimientos de origen marino con viabilidad celular a nivel del material de control (TCP) tras 7 y 14 días de incubación y con actividad metabólica (medida por densidad óptica) equivalente a los recubrimientos de origen sintético tras 21 días de incubación. Mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó la morfología de las células pre-osteoblásticas de cráneo de ratón MC3T3-E1 cultivadas sobre estos recubrimientos obtenidos a partir de hidroxiapatita comercial –HAc (Figura 3A, B) y de diente de tiburón –ST (Figura 3C, D) tras 7 y 21 días de incubación. Después de 7 días se apreció, para ambos recubrimientos (HAc y ST), una monocapa de células densa distribuida de forma uniforme por toda la superficie testada con una morfología saludable, adaptándose perfectamente a la topografía del recubrimiento y con numerosas conexiones intercelulares de tipo filopodios (Figura 3A, C). Tras 21 días se observó diferenciación celular en ambos recubrimientos con formación de matriz extracelular pre-mineralizada con una red compleja de filamentos, probablemente de colágeno, siendo mayor en el caso de los recubrimientos de origen marino –ST (Figura 3D) que en los de origen sintético –HAc (Figura 3B).

Los resultados obtenidos en estos ensayos de biocompatibilidad tanto en la morfología de los pre-osteoblastos sobre los recubrimientos a testar como en la cuantificación de la actividad metabólica de pre-osteoblastos, corroboran la enorme potencialidad y prometedora respuesta funcional de esta fuente biológica para la obtención de hidroxiapatita.

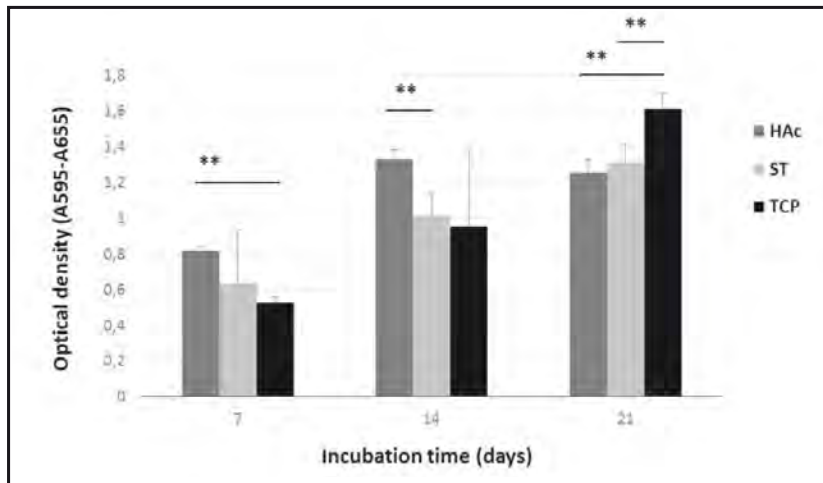


Figura 2. Valores de densidad óptica de proliferación celular de MC3T3-E1 tras 7, 14 y 21 días sobre recubrimientos de bioapatitas de diente de tiburón (ST), de hidroxiapatita de origen sintético (HAc) y el control (TCP). Diferencias estadísticas Student t test donde * es $p < 0.05$ y ** es $p < 0.01$ (Dorado y col., 2015).

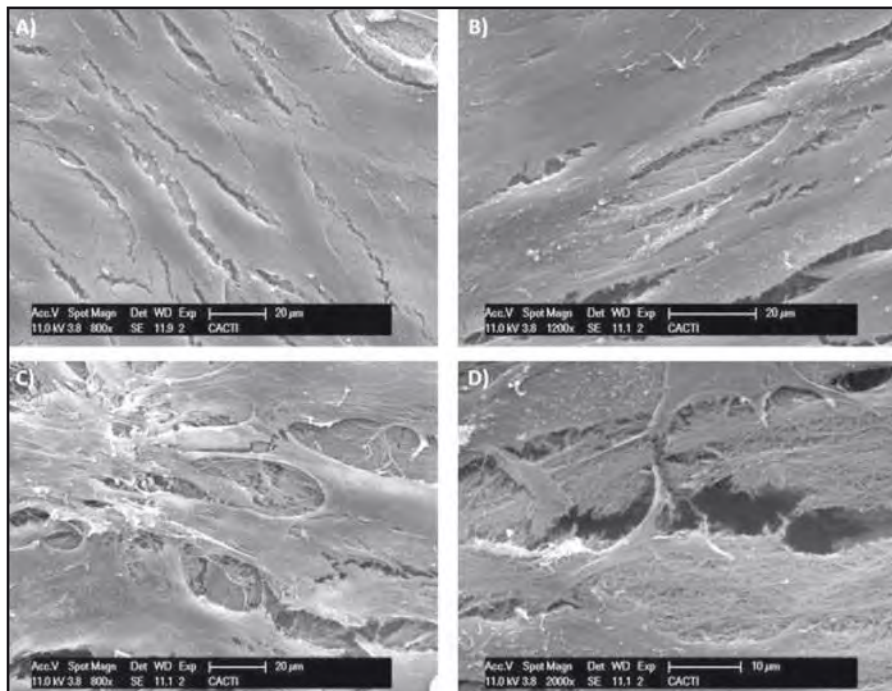


Figura 3. Micrografías SEM de la morfología de los pre-osteoblastos MC3T3-E1 tras promover su diferenciación durante 7 días (A, C) y 21 días (B, D) sobre apatitas de origen sintético (HAc) (A, B) y de origen marino ST (C, D) (Dorado y col., 2015).

4. Incorporación de elementos minoritarios en recubrimientos bioce- rámicos

La hidroxiapatita biológica presente en el hueso contiene diferentes elementos como cationes (Mg^{2+} , Na^+ , K^+) y aniones (Cl^- , F^-), que juegan un papel importante en la formación y en las funciones metabólicas del propio tejido óseo, y otros elementos como Si y Sr que están presentes en muy bajas concentraciones e implicados de forma decisiva en el desarrollo del mismo (Pereiro y col., 2012). Teniendo esto presente, una de las líneas de investigación del Grupo de Nuevos Materiales se basa en la incorporación de estos elementos en la red cristalina de la hidroxiapatita sintética para asemejar lo máximo posible a la composición natural del tejido óseo humano; ya que en este sentido, se ha demostrado que estas HA sintéticas admiten la incorporación de ciertos elementos en concentraciones traza sustituyendo otros grupos funcionales de su estructura como por ejemplo grupos fosfato o elementos como el calcio. A continuación se presentan a modo de subapartados los distintos recubrimientos de HA con incorporación de elementos traza de interés, la justificación de tal interés y los resultados de las pruebas de biocompatibilidad obtenidos para cada uno de ellos.

4.1 Tierra de diatomeas: silicio como elemento osteoinductor

El silicio juega un papel importante en el desarrollo del tejido conectivo, especialmente en las primeras etapas durante la formación del hueso. Su deficiencia está relacionada con una baja producción de colágeno la cual lleva hacia una reducción en la proliferación ósea y a la aparición de deformaciones y lesiones. Se ha demostrado también que juega un papel importante en la unión de diferentes polisacáridos y en la inducción de genes osteoblásticos que controlan la proliferación y adhesión celular (López-Álvarez y col., 2009).

La hidroxiapatita modificada con la inclusión de pequeñas concentraciones de silicio (Si-HA) ha demostrado que mejora la proliferación de los osteoblastos y la producción de matriz extracelular ósea. En este sentido, existe una teoría que afirma que los beneficios ocurren debido a que estos recubrimientos liberarían bajas cantidades de iones de silicio y calcio, estimulando la activación de 7 familias de genes en osteoblastos y por tanto, incrementando la proliferación y diferenciación celular. Por otro

lado, estas sustituciones de Si-HA se asume que aumentan la solubilidad para generar de esta forma una superficie más electronegativa y crear así una microestructura más fina dando como resultado una transformación de la superficie de implante en una apatita biológicamente más equivalente.

Utilizando como fuente de silicio tierra de diatomeas, que se compone de exoesqueletos de algas unicelulares rodeadas de una capsula silíceo, se obtuvieron recubrimientos por PLD de hidroxiapatita sintética con incorporaciones traza de silicio. Estos recubrimientos se evaluaron a nivel biológico con osteoblastos de la línea celular SaOS-2 utilizando como controles HA con silicio de origen mineral (sílice) y HA pura.

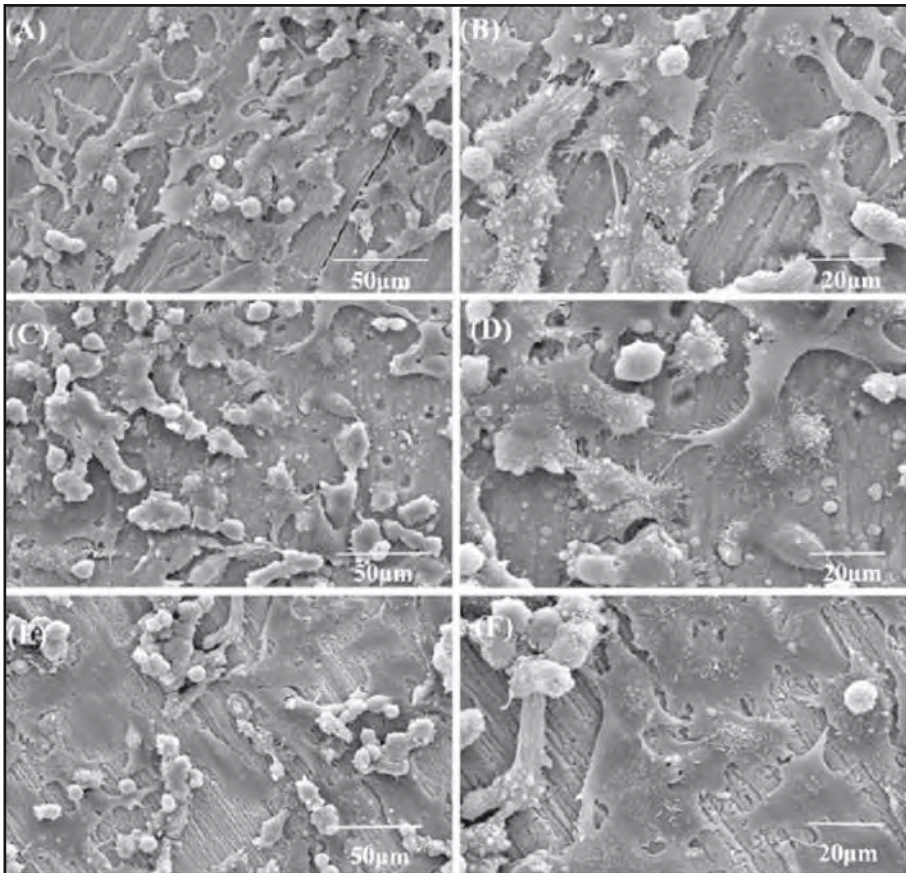


Figura 4. Micrografías obtenidas de SEM de células osteoblásticas sobre discos de titanio tras 7 días de incubación sobre discos recubiertos con HA A (x500) y B (x1000), recubrimientos de Si-HA de sílice C (x500) y D (x1000), recubrimientos Si-HA de tierra de diatomeas, E (x500) y F (x1000) (López-Álvarez y col., 2009). Copyright © 2008, Springer Science+Business Media, LLC.

En la Figura 4 se presentan micrografías SEM de la morfología celular de osteoblastos (SaOS-2) tras 7 días sobre ambos recubrimientos, HA (A, B), Si-HA de sílice (fuente mineral) (B, C), Si-HA de tierra de diatomeas (fuente biológica) (D, E). Los resultados obtenidos mostraron que estos recubrimientos Si-HA de tierra de diatomeas no son citotóxicos, las células se adhieren y proliferan bien manteniendo su morfología típica. Además, también se ha visto que tanto la proliferación como la actividad osteoblástica son mayores en el caso de discos recubiertos con Si-HA de tierra de diatomeas, incrementándose de forma significativa tras 7 días de incubación (López-Álvarez y col, 2009).

4.2 Recubrimientos multisustituidos con silicio y estroncio

Además del silicio, el estroncio es otro elemento que podemos encontrar en el esqueleto en muy baja concentración (0'01-0'02% en peso). Representa solo el 0'035 de su contenido en calcio, siendo mayor en las zonas con alta actividad metabólica. El papel que juega este elemento en el metabolismo del hueso lo hace idóneo para incorporarlo en los recubrimientos ya que, según se ha comprobado en estudios *in vitro*, incrementa el número de osteoblastos y reduce el de osteoclastos y, en pruebas *in vivo*, mejora la formación ósea (incrementando la masa) y reduce la resorción. Además en muchos países se ha aprobado el uso de este elemento, en forma de ranelato de estroncio como tratamiento para pacientes osteoporóticos ya que reduce la incidencia de fracturas en estos (Rodríguez-Valencia y col., 2013, Boanini y col., 2009).

El éxito en la incorporación de pequeñas cantidades de este elemento en recubrimientos de hidroxiapatita sintética sustituida con silicio de tierra de diatomeas (Si-Sr-HAc) ha quedado demostrado ya que, además de mantener la topografía básica de los recubrimientos biocerámicos, comparados con recubrimientos de hidroxiapatita sintética pura, se observó que aumenta en mayor medida la rugosidad superficial del mismo lo cual favorecerá su osteointegración. Se comprobó la biocompatibilidad de los recubrimientos mediante cultivo de células madre osteoprogenitoras humanas (hBMSCs) sobre los mismos y además se evaluó, mediante ensayo ALP (empleado como marcador para la diferenciación celular temprana y normalizado en cantidad de DNA) la capacidad de diferenciación de las células hBMSCs (Figura 5) cultivadas sobre discos recubiertos con hidroxiapatita sintética

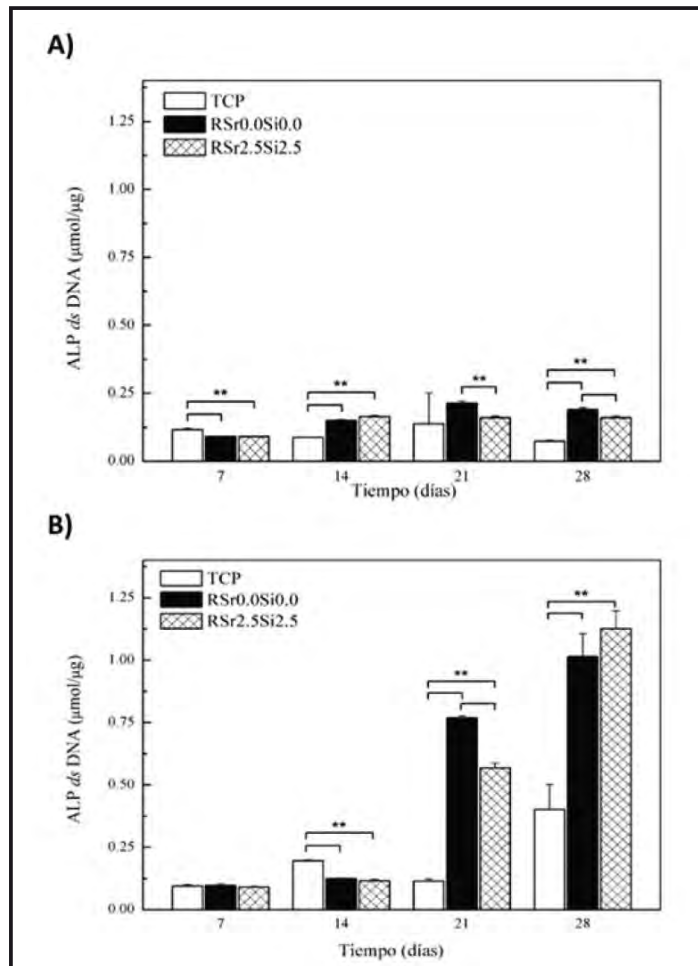


Figura 5. Actividad ALP normalizada en cantidad de dsDNA en células hBMSCs cultivadas hasta 28 días sobre recubrimientos Si_{2.5}Sr_{2.5} y Si₀Sr₀ en medio alfa-MEM (A) y medio de cultivo alfa-MEM suplementado con factores osteogénicos (B). TCPS fue utilizado como control del experimento (Rodríguez-Valencia y col., 2014b). Copyright © 2014, © SAGE Publications.

pura –RSr0.0–Si0.0 (barra negra) e hidroxiapatita sustituida con silicio de tierra de diatomeas y con incorporación de estroncio –Rsr2.5Si2.5 (barra cuadriculada), empleando como control de estado saludable del cultivo celular *Tissue Culture Polystyrene* –TCP (barra blanca). Además, en este ensayo se emplearon dos medios de cultivo diferentes, uno suplementado con factores osteogénicos que favorecen la diferenciación celular (Figura 5B) y otro medio de cultivo en el que no se incluyeron estos factores (Figura 5A), observándose que en el caso del cultivo con factores

osteogénicos se produce diferenciación celular en ambos recubrimientos (Rsr2.5Si2.5 y Rsr0.0-Si0.0), siendo mayor en el caso de recubrimientos de hidroxiapatita sintética pura tras 21 días. La diferenciación celular del TCP se observó a los 28 días de incubación y a este tiempo se pudo comprobar cómo la diferenciación de los recubrimientos multisustituídos remontó por encima de los recubrimientos de HA sintética pura (Rodríguez-Valencia y col., 2013).

4.3 El selenio

Otro elemento minoritario que podemos encontrar en los tejidos biológicos es el selenio. Éste es cofactor de la enzima glutatión peroxidasa que actúa como antioxidante previniendo la degeneración celular en los tejidos, manteniendo bajos los niveles de peróxido de hidrogeno en las células y reduciendo así el daño frente a los radicales libres. La deficiencia en selenio está relacionada con dos enfermedades endémicas del área de China, Keshan y Kashin-Beck. La primera provoca cardiopatías, principalmente en niños, mientras que Kashin-Beck se asocia a una condrodistrofia que provoca lesiones degenerativas y necróticas en huesos largos y cartílago dando como resultado una osificación irregular, reducción del crecimiento y posible enanismo (Rodríguez Valencia y col., 2012). Estudios sobre sus propiedades antibacterianas han demostrado la efectividad del selenio sobre la colonización de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, que son causantes de la mayoría de las infecciones que se pueden llegar a producir tras una intervención quirúrgica. La presencia de selenio cataliza la formación de los radicales superóxido que inhiben la unión de estas bacterias y la posterior formación de colonias (Tran y col., 2009).

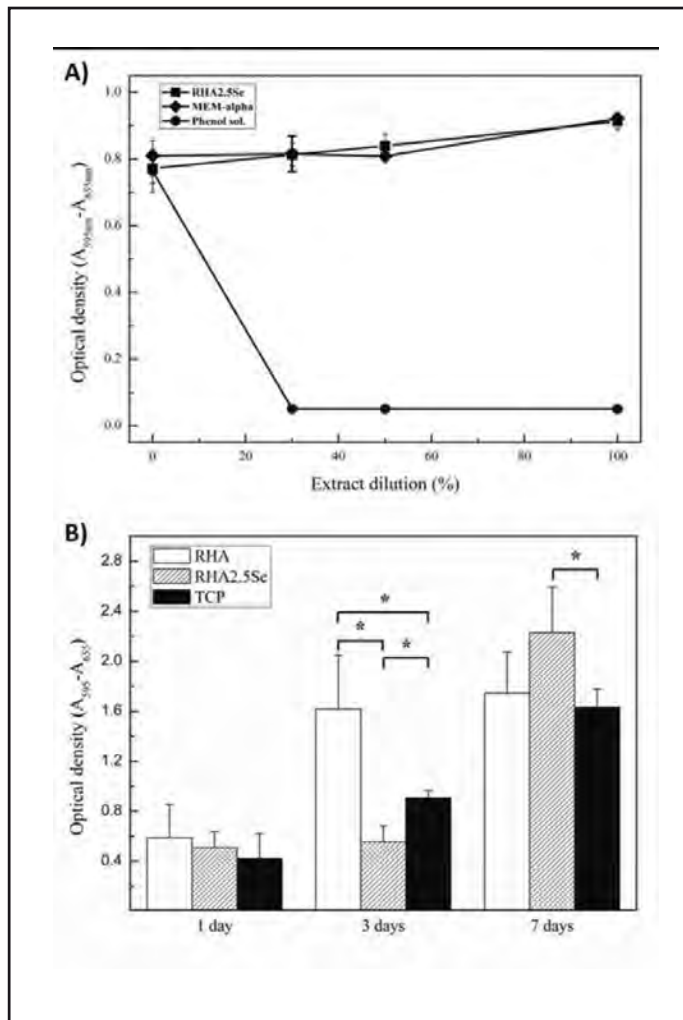


Figura 6. A) Test de extracción por solvente (ensayo MTT) para recubrimientos HA2.5Se con controles positivo y negativo, solución de fenol y medio de cultivo alfa-MEM, después de sembrar la línea celular MC3T3-E1. B) Resultados de proliferación celular (ensayo MTT) después de incubar células MC3T3-E1 durante 1, 3 y 7 días sobre recubrimientos HA2.5Se, HA y TCP como control del experimento (Rodríguez-Valencia y col., 2014a).

Se evaluó la citotoxicidad de los recubrimientos de hidroxapatita con incorporación de selenio (HA2.5Se) mediante test de extracción por solvente, cultivando células pre-osteoblásticas de cráneo de ratón MC3T3-E1 con diluciones crecientes de extractos de recubrimientos HA2.5Se, utilizando medio de cultivo MEM-alpha como control negativo del experimento y solución de fenol a una concentración de 6'4 g/l

como control positivo para la citotoxicidad (Figura 6A). Los resultados obtenidos mostraron ausencia de citotoxicidad de los extractos obtenidos de recubrimientos HA2.5Se. Además, se evaluó la proliferación celular de las células MC3T3-E1 (ensayo MTT) cultivadas sobre discos recubiertos con HA2.5Se (barra a rayas) comparada con recubrimientos HA pura y empleando como control del estado saludable del cultivo celular *Tissue Culture Polystyrene* –TCP (barra negra) (Figura 6B). Se ha observado que los recubrimientos dopados con selenio favorecen la proliferación celular siendo esta más acusada después de 7 días de incubación. En este sentido, la incorporación de bajas cantidades de selenio en recubrimientos con hidroxiapatita supone un gran punto a su favor en aplicaciones clínicas debido a que además de mejorar la osteointegración del implante, reduciría las infecciones que se pudiesen ocasionar (Rodríguez-Valencia y col., 2012).

5. Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran la biocompatibilidad de apatitas biológicas obtenidas de dientes de tiburón (*Prionace glauca*) depositadas en forma de recubrimiento mediante tecnología láser PLD. Por otra parte, se prueba mediante testado con osteoblastos, la mejora de la funcionalidad de recubrimientos de apatitas sintéticas, en los que se han incorporado elementos traza (tales como silicio de origen marino, estroncio y selenio) siendo más favorable su respuesta biológica que en apatitas sintéticas puras.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al personal del CACTI (Centro de Apoyo Científico e Tecnológico á Investigación, Universidade de Vigo) por la asistencia técnica y a las entidades que han financiado parcialmente esta investigación: UE-POCTEP 0330IBEROMARE1P project, UE-INTERREG 2011-1/164MARMED project, UE-INTERREG IIIA (SP1.P151/03) PROTEUS, Ministerio de Ciencia e Innovación (MAT2010-18281), Fundación Mutua Madrileña project 2013, Xunta de Galicia (2006/12; PGIDITO5PXIC30301PN; 2010/83 y FEDER GRC2013-008), Universidade de Vigo 13VI05. M. López-Álvarez agradece la financiación de FP7/REGPOT-2012-2013.1 (Nº 316265, BIOCAPS).

Referencias bibliográficas

- Anselme K. (2000) Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21: 667-681.
- Boanini E., Gazzano M., Bigi A. (2010) Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*, 6 (6): 1882-1894.
- Dorado J., Hidalgo-Robatto B. M., Rodríguez-Valencia C., López-Álvarez M., Serra J. y col. (2015). Recubrimientos CaP- F/Cu/Zn para aplicaciones biomédicas. III Jornadas de Investigación BIOINTEGRASAÚDE. Vigo, España.
- Joachim E., Prymak O., Raabe D., Epple M. (2012) Structure, composition, and mechanical properties of shark teeth. *Journal of Structural Biology*, 178 (3): 290-299.
- López-Álvarez M., Solla E. L., González P., Serra J., León B. y col. (2009) Silicon-hydroxyapatite bioactive coatings (Si-HA) from diatomaceous earth and silica. Study of adhesion and proliferation of osteoblast-like cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20: 1131-1136.
- Narayanan R., Seshadri S. K., Kwon T. Y., Kim K. H. (2008) Calcium phosphate-based coatings on titanium and its alloys. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, 85: 279-299.
- Pereiro I., Rodríguez-Valencia C., Serra C., Solla E. L. y col., (2012) Pulsed laser deposition of strontium-substituted hydroxyapatite coatings. *Applied Surface Science*, 258 (23): 9192-9197.
- Phong P., Webster T. J. (2008) Enhanced osteoblast adhesion on nanostructured selenium compacts for anti-cancer orthopedic applications. *International Journal of Nanomedicine*, 3 (3): 391-396.
- Rodríguez-Valencia C., López-Álvarez M., Cochón-Cores B., Pereiro I., Serra J. y col. (2014) Novel selenium-doped hydroxyapatite coatings for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 101 A: 853-861.
- Rodríguez-Valencia C., Pereiro I., Pirraco R. P., López-Álvarez M., Serra J. y col. (2014) Human mesenchymal stem cells response to multi-doped silicon-strontium calcium phosphate coatings. *Journal of Biomaterials Applications*, 28 (9): 1397-1407.
- Solla E. L., González P., Serra J., Chiussi S., León B. y col. (2007) Pulsed laser deposition of silicon substituted hydroxyapatite coatings from synthetical and biological sources. *Applied Surface Science*, 254: 1189-1193.
- Tran P. L., Hammond A. A., Mosley T., Cortez J., Gray T. y col. (2009) Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75 (11): 3586-3592.

Colagénio Marinho: valorização de subprodutos marinhos com vista à regeneração de tecidos

Ana L. P. Marques^{1,2}, Carmen G. Sotelo^{3*}, Gabriela S. Diogo^{1,2}, Joana Moreira-Silva^{1,2}, María Blanco³, Tiago H. Silva^{1,2*}, Ricardo I. Pérez-Martín³, Rui L. Reis^{1,2}

¹ 3B's Research Group - Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, AvePark, 4805-017 Barco, Guimarães, Portugal.

² ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

³ Instituto de Investigaciones Marinas (CSIC), Eduardo Cabello 6, 36208 Vigo, España.

*tiago.silva@dep.uminho.pt; carmen@iim.csic.es

Resumo

Colagénio é o grupo de proteínas mais abundantes nos organismos vertebrados e invertebrados, incluindo mamíferos, possuindo um papel fundamentalmente estrutural. Existem, descobertos até agora, 28 tipos de colagénio, cada um com uma organização específica em diferentes tecidos, como osso, tendão, cartilagem, pele ou córnea. Tendo um papel tão determinante nos tecidos biológicos, é um dos materiais mais utilizados em engenharia de tecidos: consoante o tecido que se quer regenerar é escolhido o tipo de colagénio a utilizar. Sendo já usado em diversas indústrias, como farmacêutica, alimentar ou cosmética, a principal fonte é de origem bovina ou suína. No entanto, devido ao risco de transmissão de doenças ou fatores religiosos, os organismos marinhos têm adquirido especial atenção. É possível isolar colagénio de peles de peixes e utilizá-lo em diversas áreas. Neste capítulo damos ênfase ao processo de extração de colagénio tipo I e algumas aplicações na área da engenharia de tecidos, nomeadamente na produção de membranas, hidrogéis e compósitos, com aplicação em libertação controlada de fármacos e regeneração de tecidos biológicos.

1. Introdução

O colagénio constitui uma das principais proteínas estruturais dos metazoários, estando presente em diversas estruturas destes organismos, como o tecido conjuntivo, estruturas ósseas e cartilaginosas, pele, etc. (Shigeru e Masataka, 1999). Esta proteína é um dos constituintes de macroestruturas e tecidos onde é necessária alguma resistência, formando uma rede onde inúmeras moléculas estão ligadas de diversos modos. No caso de estruturas como os tendões ou ossos, as unidades de colagénio alinham-se, formando fibrilas, que por sua vez se associam longitudinalmente (Figura 1), dotando as estruturas de grande resistência e capacidade de suportar tensão. No caso do osso e cartilagem, as fibras de colagénio acomodam-se formando uma rede que permite a disposição de outras biomoléculas e compostos inorgânicos.

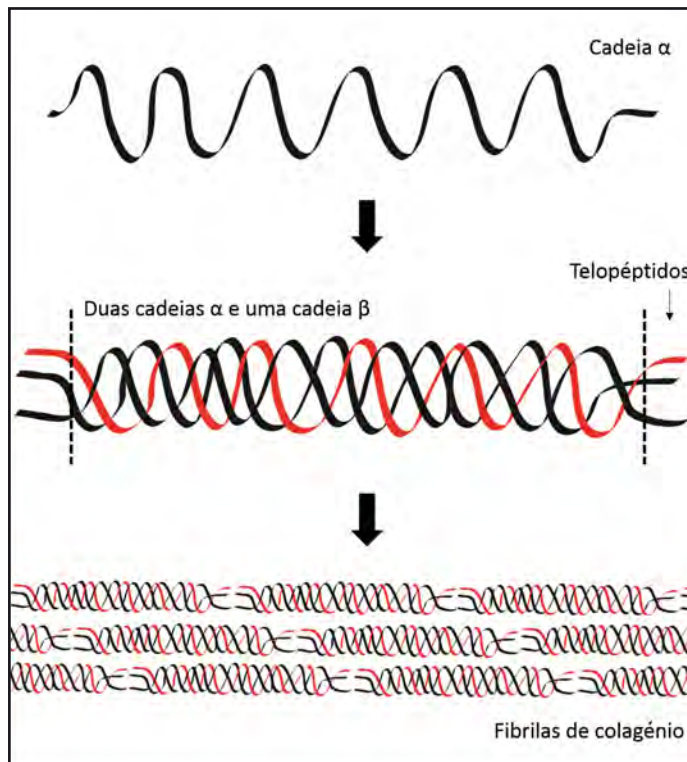


Figura 1. Organização estrutural das moléculas de colagénio: em cadeias polipeptídicas, estas em tripla hélice e estas últimas em fibrilas.

Existem 28 tipos de colagénio, conhecidos até agora, que apresentam pequenas diferenças a nível da sua estrutura primária ou quaternária, conferindo às fibras resultantes diferentes características estruturais (Ricard-Blum, 2011).

Em geral, os diferentes tipos de colagénio apresentam uma estrutura quaternária composta por três subunidades alfa que, dependendo do tipo de colagénio, podem apresentar pequenas diferenças tanto a nível de peso molecular como da sua composição de aminoácidos (Bailey e col., 1998). Estas cadeias alfa são constituídas por uma hélice alfa levogira que se dispõem formando uma super-hélice dextrógira, e que se estabiliza consoante a existência de ligações covalentes entre as cadeias (Benjakul e col., 2012).

O tipo de colagénio mais estudado no caso das espécies marinhas é o colagénio tipo I, caracterizando-se pela presença de dois tipos de cadeias alfa (α), cada uma com um peso molecular de cerca de 100 kDa e uma cadeia beta (β) (Gómez-Guillén e col., 2002, Singh e col., 2011, Sotelo e col., *submetido*) (Figura 2).

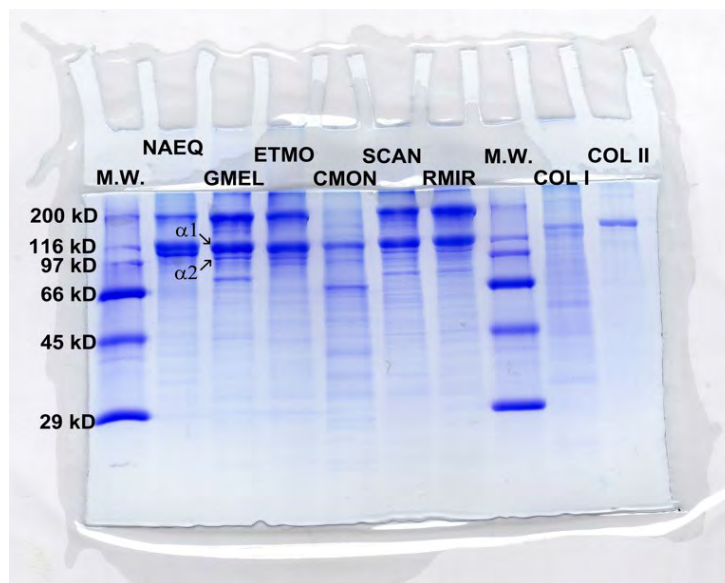


Figura 2. SDS-PAGE de colagénio solúvel em ácido extraído da pele de teleósteos e condríctes. MW: Peso molecular padrão; NAEQ: *Nezumia aequalis*; GMEL: *Galeus melanostictus*; ETMO: *Etmopterus spp.*; CMON: *Chimaera monstrosa*; SCAN: *Scyliorhinus canicula*; RMIR: *Raja miraletus*; COL I: colagénio tipo I bovino, COL II: colagénio tipo II bovino.

As propriedades do colagénio, como em qualquer proteína, são determinadas pela sua composição de aminoácidos. Esta proteína tem uma composição particular, uma vez que grande parte das subunidades alfa se caracteriza pela repetição da sequência X-Y-Gly, pelo que o aminoácido Glicina (Gly) constitui aproximadamente 1/3 do total de aminoácidos desta proteína (Horng e col., 2007). Outra característica importante é a presença de aminoácidos em que o azoto da amina está ligado não apenas a um mas a dois carbonos num anel cíclico (anteriormente conhecidos como iminoácidos), como a prolina e a hidroxiprolina, que explica algumas características físico-químicas do colagénio e que podem ser fundamentais na estabilidade da sua tripla hélice (Jongjareonrak e col., 2010). O conteúdo destes aminoácidos na pele de peixes encontra-se entre 150 e 170 resíduos/1000, valores inferiores aos encontrados em colagénio de mamíferos (Regenstein e Zhou, 2006).

Outras propriedades, como a capacidade de gelificação ou a viscosidade, dependem também da composição de prolina, hidroxiprolina e outros aminoácidos. A temperatura de fusão do colagénio e gelatinas de mamíferos encontra-se entre os 30 °C e os 33 °C, enquanto para peixes de água quente pode oscilar entre os 23 °C e 29 °C (Hwang e col., 2007). Sotelo e colegas sugerem a existência de uma correlação positiva entre a percentagem de hidroxilação da prolina presente no colagénio solúvel em ácido (ASC, do inglês *Acid Soluble Collagen*), da pele de distintas peles de peixe, com a temperatura de desnaturação do colagénio (Sotelo e col., *submetido*).

O colagénio tem diversas aplicações industriais, sendo que as mais conhecidas se encontram no âmbito da indústria alimentar e cosmética (Li e col., 2005, Gómez-Guillén e col., 2011, Hashim e col., 2015), existindo já um campo de aplicação emergente relativamente a materiais biomédicos (Nagai e col., 2004, Hoyer e col., 2012).

As atuais indústrias de produção de colagénio utilizam resíduos provenientes do processamento de carne, tal como peles e ossos de suínos e bovinos. No entanto, desde o aparecimento de doenças como a encefalopatia espongiiforme bovina (BSE, do inglês *bovine spongiform encephalopathy*) derivadas do consumo de animais de criação que contém príões causadores da doença, a utilização destas fontes é vista com alguma apreensão. Por outro lado, a quantidade de subprodutos originários da indústria pesqueira é significativa, alcançando valores

de até 55% do total do peso do produto a processar, dos quais 30% poderiam servir como matéria-prima para a obtenção de compostos com grande valor acrescentado como o colagénio marinho, incluindo pele, espinhas e escamas (Gómez-Guillén e col., 2002, Kittiphattanabawon e col., 2010a,b). No entanto, na maioria das indústrias de processamento, a gestão e o tratamento destes subprodutos representam um problema sendo utilizados, no melhor dos casos, como matéria-prima para o fabrico de farinhas de peixe ou fertilizantes (Nagai e Suzuki, 2000).

No caso concreto da Galiza, em Espanha, onde se concentra uma boa parte do sector pesqueiro espanhol, os principais geradores de subprodutos de peixe são as indústrias de transformação e elaboração de produtos da pesca (incluindo aqui as conservas), os mercados e exportadores de peixe, plantas de aquicultura e barcos de pesca. Ter uma estimativa dos subprodutos gerados por cada um destes intervenientes na cadeia de valor é bastante difícil, em parte devido à dispersão e fragmentação dos próprios operadores, não existindo estatísticas fiáveis a esse respeito. Os autores deste trabalho têm recorrido a entrevistas diretas, obtendo informações ao longo dos últimos cinco anos e, de entre as principais conclusões, realça-se uma significativa acumulação de matéria-prima na Galiza e em Portugal, que poderia sustentar uma possível indústria de produção de colagénio e gelatina de espécies de origem marinha. Como exemplo, só no mercado de Vigo durante o ano 2012, foi recolhida aproximadamente 1 tonelada de peles de peixe de diversas espécies. No caso de Portugal, cuja indústria do processamento de pescado é inferior à espanhola, a acumulação de subprodutos pode chegar a atingir 7000 toneladas anuais, das quais é difícil diferenciar os tipos de subprodutos. Mas, se estimarmos que cerca de 10% desses subprodutos são peles, teríamos uma quantidade de 70 toneladas de matéria-prima para a obtenção destas duas proteínas de origem marinha. Outra importante fonte de colagénio e gelatina é representada pelos descartes das espécies marinhas sujeitas a cotas ou TACs (do inglês *Total Allowable Captures*) os quais, após a entrada em vigor da atual Diretiva Europeia (Regulamento UE nº 1380, 2013), devem ser desembarcados obrigatoriamente. Este novo regulamento é um desafio para o sector das pescas, uma vez que é necessário encontrar alternativas viáveis de valorização para os produtos a descartar, para amortecer o impacto económico envolvido em trazer para terra uma captura que, até ao momento, carece de valor comercial.

Uma das alternativas que temos vindo a defender é a extração de colagénio e gelatinas e sua utilização em sectores de maior valor acrescentado, nomeadamente o biomédico. É essa abordagem que exploramos nas secções seguintes.

2. Extração de colagénio de fontes marinhas

No processo de extração de colagénio de recursos marinhos, as variáveis que podem afetar o rendimento e propriedades do colagénio extraído incluem os próprios materiais, os tipos de reagentes utilizados e a sua concentração, o tempo de reação e a temperatura a que são realizadas as etapas do processo (Regenstein e Zhou, 2006). De um modo geral, a metodologia de extração consta de uma primeira etapa de eliminação de impurezas e de outros componentes que podem estar presentes no material a utilizar, nomeadamente outras proteínas distintas do colagénio, lípidos, pigmentos, cálcio e outros componentes inorgânicos, sendo este um passo que permite um incremento da pureza do colagénio extraído. Com esta finalidade, diversos autores recorrem ao tratamento alcalino utilizando geralmente hidróxido de sódio (NaOH) 0'1M (Nam e col., 2008, Benjakul e col., 2010, Matmaroh e col., 2011, Liu e col., 2012, Sotelo e col., *submetido*), sendo menos utilizado o cloreto de sódio (NaCl) por ser menos eficaz na eliminação de albuminas e globulinas, assim como o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Sadowska e col., 2003, Wang e col., 2007, Zhang e col., 2009). No entanto, o NaCl é utilizado em concentrações mais elevadas para a precipitação do colagénio extraído, num passo posterior (Nagai e Suzuki, 2000). Quando a matéria-prima contém grandes quantidades de cálcio, como no caso de espinhas e escamas, recorre-se ao uso de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou outros ácidos orgânicos, para a descalcificação das amostras (Kittiphattanabawon e col., 2005). O uso de álcool (álcool butílico ou etílico) é indicado para a remoção de gorduras e pigmentos presentes na matéria-prima (Nagai e col., 2002, Senaratne e col., 2006). A fim de facilitar a eliminação dos componentes referidos anteriormente e melhorar a extração de colagénio, é recomendável a redução do tamanho das amostras a utilizar, por trituração e/ou moagem.

No procedimento principal para o isolamento de colagénio é utilizado um meio de extração de carácter ácido, no qual o colagénio se solubiliza, obtendo-se ASC. Em simultâneo, ou num passo seguinte, pode utilizar-se

uma enzima, pepsina, para facilitar a solubilização do restante colagénio no referido meio, obtendo-se PSC (do inglês, *Pepsin Soluble Collagen*). O ácido acético é o mais utilizado neste tipo de extração, conseguindo-se um efeito de repulsão entre as moléculas de colagénio devido à carga positiva adquirida pelas cadeias polipeptídicas que formam o colagénio, ajudando na sua solubilização (Benjakul e col., 2012). O rendimento da extração, determinado geralmente em função do conteúdo de hidroxiprolina (por ser considerado um aminoácido específico do colagénio), varia em função da espécie, idade, estado da matéria-prima e do protocolo e condições de extração (Sikorski, 1994, Foegeding e col., 1996, Badii e Howell, 2003, Nalinanon e col., 2007, Zelechowska e col., 2010). Vários autores realizaram a extração de colagénio de distintas espécies marinhas utilizando 0,5M ácido acético a 4 °C durante 24-48h (Matmaroh e col., 2011), mostrando, em algumas ocasiões, uma relação direta entre um maior rendimento de colagénio e incrementos na concentração de ácido acético utilizado (Benjakul e col., 2012) ou maior tempo de reação (Nalinanon e col., 2007). Os rendimentos obtidos mediante a solubilização do colagénio em ácido são frequentemente baixos e, por este motivo, recorre-se ao uso de pepsina. Esta enzima hidrolisa especificamente os péptidos nas regiões não helicoidais da molécula, denominadas telopéptidos, aumentando assim a eficiência na extração (Nalinanon e col., 2007, Kittiphattanabawon e col., 2010a). As vantagens do uso de pepsina no procedimento de extração do colagénio incluem a eliminação de proteínas não colagenosas (devido à ação hidrolítica da pepsina) (Kittiphattanabawon e col., 2010b), aumento do rendimento da extração em ácido (Singh e col., 2011) e redução da antigenicidade associada aos telopéptidos (Lynn e col., 2004), aumentando assim a possibilidade de incorporação deste colagénio em produtos alimentares e em diferentes aplicações biomédicas (Lynn e col., 2004).

3. Aplicações biomédicas de colagénio

3.1. Membranas para libertação controlada de fármacos

3.1.1. Sistemas de libertação controlada

O método de administração de um composto farmacêutico num determinado local e com uma taxa de libertação específica é comumente

designado de *libertação controlada* de um fármaco. O número de estudos sobre este tópico tem vindo a crescer nas últimas décadas, na tentativa da obtenção de sistemas com as características desejadas para determinado fim. Esta tornou-se numa área multidisciplinar, envolvendo conhecimentos dos campos da química, física, biologia, conceitos de biofarmacêutica, fármaco-cinética e, com o desenvolvimento de novas técnicas de processamento de polímeros, bioengenharia (Ranade e col., 2003).

Os sistemas de libertação têm evoluído de modo a maximizar a sua eficácia terapêutica (Ranade e col., 2003). Existem diversos tipos de sistemas, como hidrogéis, nano/micro cápsulas, nano/micro esferas, lipossomas, micelas, dendrímeros e também nanotubos de carbono, demonstrando propriedades atrativas tendo em vista a libertação de fármacos. Também membranas produzidas por eletrospinning (*electrospinning*) ou por moldação por evaporação de solvente (*solvent casting*) podem ser utilizadas neste sentido. Alguns destes sistemas têm como base materiais poliméricos, podendo estes ser tanto naturais como sintéticos.

Os sistemas para libertação de fármacos, quer sejam de origem natural ou sintética, devem compreender requerimentos importantes de modo a evitar efeitos nefastos para o organismo (Chasin e Langer, 1990), nomeadamente:

- mínimo de efeito biológico secundário possível após inserção;
- o material constituinte deverá ser biodegradável e tanto o primeiro como os compostos resultantes da degradação deverão ser biocompatíveis e/ou facilmente excretados pelo organismo;
- ausência de impurezas ou produtos químicos utilizados na sua preparação (como agentes de reticulação).

Estes sistemas são dotados de algumas funcionalidades cujos métodos tradicionais não conseguem acompanhar (Ranade e col., 2003), particularmente:

- acesso a locais inacessíveis por vias cirúrgicas;
- especificidade do local de libertação;
- entrega da quantidade desejada de fármaco;

- capacidade de controlo da taxa de libertação.

Os sistemas que consigam reunir estas propriedades são desejáveis, conseguindo ultrapassar algumas das lacunas existentes nos métodos atuais.

3.1.2. Diferentes tipos de sistemas de libertação de fármacos

Os sistemas de libertação de fármacos podem ser diferenciados em 4 grupos (Chasin e Langer, 1990, Ranade e col., 2003):

Sistemas de libertação controlados por difusão

Estes sistemas podem ser de dois tipos: matrizes ou reservatórios. Nos primeiros, o fármaco estará uniformemente distribuído ao longo da matriz, sendo libertado a uma taxa uniforme. No segundo caso, o reservatório é, normalmente, de forma esférica ou cilíndrica, contendo o fármaco no seu interior numa solução líquida ou em pó. São as propriedades do conjunto polímero/fármaco que definem a difusão e a taxa de libertação. No entanto, este tipo de sistema levanta preocupações específicas: remoção dos reservatórios do organismo após finalizada a libertação do fármaco ou possibilidade de rotura do sistema e consequente libertação de doses muito elevadas do fármaco para o organismo (Figura 3).

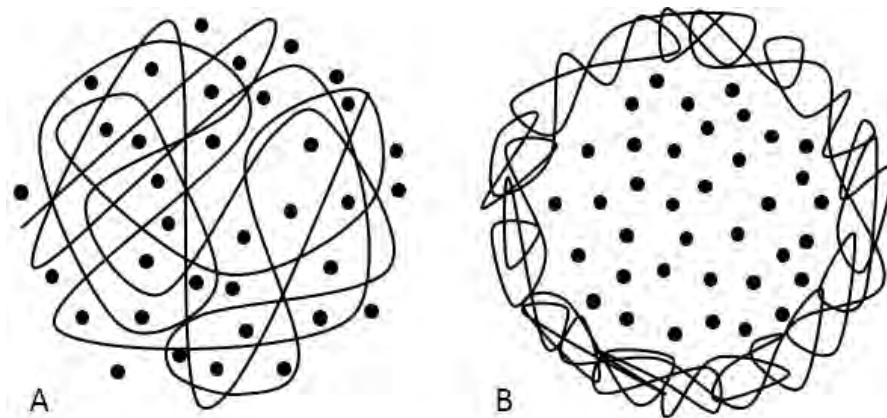


Figura 3. Modelos esquemáticos de sistemas de libertação controlados por difusão: A) Sistema matricial; B) Sistema de reservatório.

Sistemas de libertação ativados por solvente

Estes poderão ser de dois tipos: controlados osmoticamente ou com sistema de inchamento/expansão. Os primeiros são constituídos por um núcleo, que contém o fármaco, sendo este revestido por uma membrana semi-permeável à água que tem um pequeno orifício. Havendo, no interior da membrana, um agente osmótico que estimula a entrada de água através da mesma, ocorre um aumento de volume da membrana para o interior forçando o fármaco a sair através do orifício (Figura 4). Nos sistemas de inchamento é utilizado um polímero hidrofílico reticulado que consegue absorver grandes quantidades de água sem que ocorra a sua dissolução. A taxa de libertação do fármaco é proporcional à entrada de água e consequente expansão das cadeias macromoleculares (Figura 5).

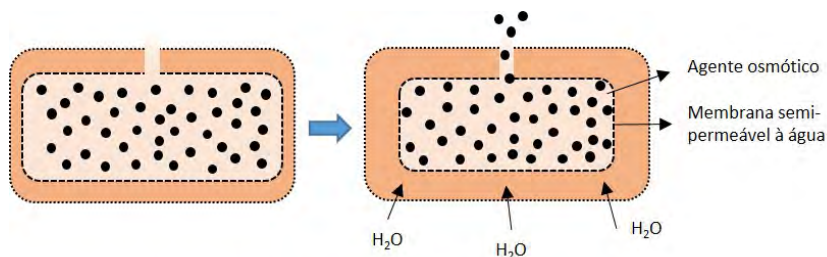


Figura 4. Modelo esquemático de sistema de libertação de fármacos ativado por solvente: controlado osmoticamente. Javad Shokri and Khosro Adibkia (2013). Application of Cellulose and Cellulose Derivatives in Pharmaceutical Industries, Cellulose - Medical, Pharmaceutical and Electronic Applications, Dr. Theo G.M. Van De Ven (Ed.), ISBN: 978-953-51-1191-7, InTech, DOI: 10.5772/55178. Available from: <http://www.intechopen.com/books/cellulose-medical-pharmaceutical-and-electronic-applications/application-of-cellulose-and-cellulose-derivatives-in-pharmaceutical-industries>

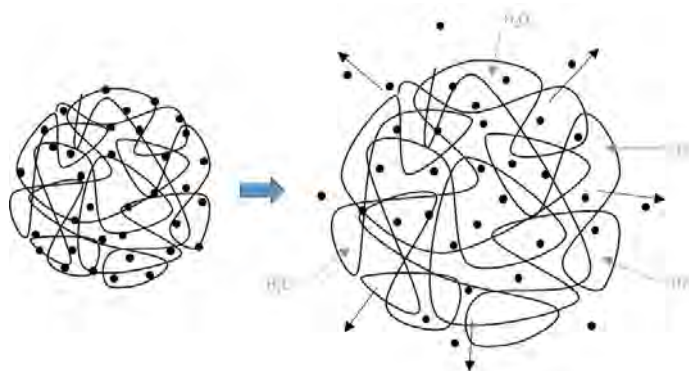


Figura 5. Modelo esquemático de sistema de libertação de fármaco controlado por expansão.

Sistemas de libertação controlados por ação química

Estes sistemas podem ser divididos em dois tipos: sistemas biodegradáveis e sistemas de "cadeias pendentes". Nos primeiros, sistemas biodegradáveis, tal como o nome indica, o polímero é biodegradável e com a sua degradação ocorre a libertação do fármaco que se encontra disperso ou dissolvido na matriz (Figura 6). Nos sistemas de cadeias pendentes o fármaco encontra-se quimicamente ligado ao polímero. Por ação enzimática ou hidrólise essa ligação é quebrada, ocorrendo libertação do fármaco.

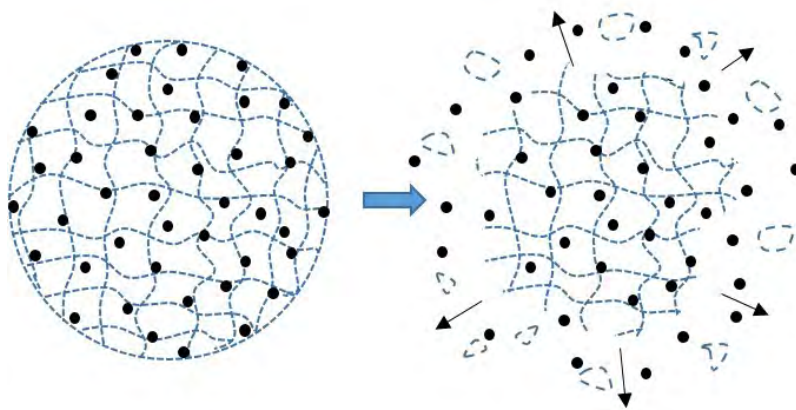


Figura 6. Modelo esquemático de sistema biodegradável de libertação de fármacos.

Sistemas controlados magneticamente

São sistemas de libertação de microesferas magnéticas e albumina que foram desenvolvidos para atuarem especificamente em tumores. Teoricamente, sendo estas partículas magnéticas, tornam mais fácil e precisa a sua localização: serão, assim, mais eficientes em relação ao local selecionado para libertação do fármaco.

3.1.3. Biomateriais em libertação controlada

Diversos polímeros podem ser utilizados em sistemas de libertação de fármacos, tanto naturais como sintéticos, podendo-se selecionar um ou mais para o mesmo sistema. Os polímeros sintéticos oferecem composição controlada, reprodutibilidade e degradação passível de ser ajustada. Consistem essencialmente em poli-hidroxiácidos e ésteres, como o

ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Os polímeros naturais como o colagénio, alginato ou quitosano são também amplamente utilizados por possuírem normalmente uma elevada taxa de biocompatibilidade (Uchegbu e Schatzlein, 2006).

O colagénio é um biomaterial natural com excelentes propriedades, sendo biocompatível, biodegradável e com baixa antigenicidade, tornando-se numa escolha lógica para uso em engenharia de tecidos (Uchegbu e Schatzlein, 2006). É utilizado em diversas aplicações, singularmente ou em compósitos, em *scaffolds*, membranas ou partículas, e em diferentes áreas como indústria cosmética, alimentar ou farmacêutica. Os diversos tipos de colagénio estão distribuídos por diferentes estruturas do corpo, sendo o colagénio tipo I o mais abundante, presente em tecidos como a pele, osso ou tendão.

São comumente utilizadas fontes bovinas ou porcinas para obtenção desta proteína. No entanto, uma nova fonte tem vindo a captar as atenções da comunidade científica. O colagénio marinho, obtido de subprodutos da indústria alimentar, como peles de peixe, é cada vez mais procurado, tal como referido anteriormente, apresentando propriedades que se assemelham às do colagénio bovino ou porcino.

3.1.4. Membranas de colagénio de tubarão para libertação controlada

A matriz extracelular tem como principais constituintes o colagénio, juntamente com glicoproteínas e proteoglicanos, sendo de importância crucial para a morfogénese, estrutura e função dos tecidos vivos (Song e col., 2006). A escolha do(s) polímero(s) para a produção de sistemas análogos à matriz extracelular, numa lógica de engenharia de tecidos, é de extrema importância, pois irá afetar as propriedades (físicas, químicas e biológicas) da matriz produzida. Neste sentido o colagénio é apontado como um dos polímeros que mais se adequa à produção de membranas ou *scaffolds* para substituição da matriz extracelular.

Técnicas como *electrospinning* ou *solvent casting* permitem a incorporação de um fármaco aquando do desenvolvimento de membranas. Num estudo realizado pelos autores deste capítulo, extraíu-se colagénio tipo I de peles de tubarão pata-roxa (*Scyliorhinus canicula*), que foi utilizado para a

produção de membranas por *solvent casting*, com dexametasona dispersa por toda a sua extensão. A dexametasona é um fármaco esteróide com propriedade anti-inflamatória, podendo ser incorporada em diversos sistemas poliméricos, nomeadamente membranas de colagénio, para serem utilizadas em tratamentos de feridas de pele.

Nesse trabalho prepararam-se membranas de colagénio a partir de uma solução de colagénio a 1% em ácido acético 0'5 M, depositada em moldes apropriados e deixando o solvente evaporar, resultando em membranas com a forma pretendida (Figura 7).

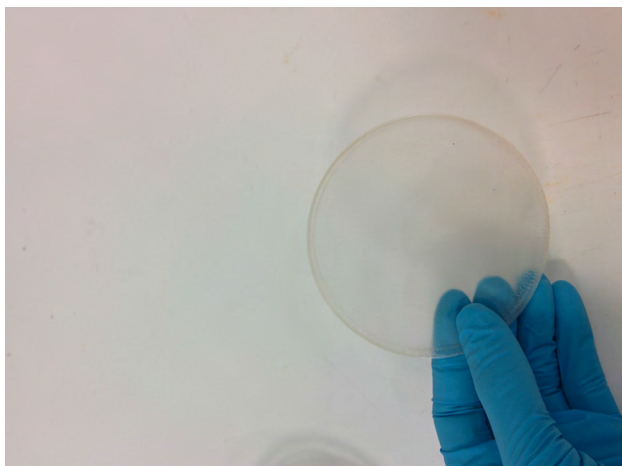


Figura 7. Membrana de colagénio de tubarão, obtida por *solvent casting*.

Para estabilizar a estrutura da membrana e impedir a sua rápida dissolução em água, testou-se a influência de um reticulante – hexametilenodisocianato (HMDI), em proporções de 1% e 5% relativamente ao colagénio, avaliando diferentes tempos de reação. A influência do reticulante na hidrofobicidade das membranas foi demonstrada pela química da sua superfície, nomeadamente pela quantificação dos grupos amina livres: com uma maior quantidade de HMDI e um maior tempo de reação, existem menos grupos amina livres (a reação de reticulação faz-se através destes grupos), resultando numa diminuição da hidrofobicidade da membrana.

Relativamente aos estudos com o fármaco modelo, dexametasona, este foi incorporado na membrana durante a sua preparação, dissolvido previamente em acetona e adicionando-o à solução de colagénio. As membranas com maior grau de reticulação mostraram ser aquelas cuja

taxa de liberação do fármaco foi mais baixa. No entanto, em todos os casos, cerca de 8 horas após o início da liberação do fármaco, foi atingida uma situação de equilíbrio (Figura 8).

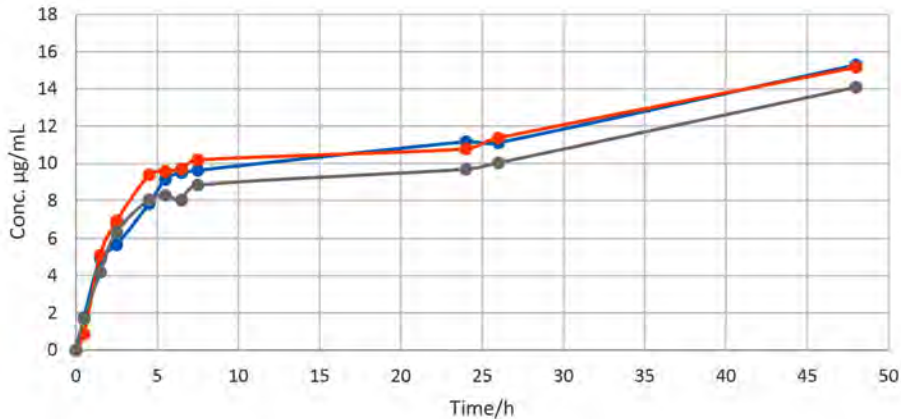


Figura 8. Perfil de liberação de dexametasona por membranas de colagénio de tubarão.

Trata-se, assim, de um sistema de liberação controlado por difusão, pois embora a membrana seja constituída por colagénio, biodegradável, a liberação do fármaco ocorre por entrada de água no sistema e posterior mobilidade do fármaco para o local onde a sua concentração era menor – o exterior da membrana – até que se atinja uma situação de equilíbrio.

3.2. Hidrogéis

Os hidrogéis têm vindo a receber uma grande atenção por parte da comunidade científica, tendo em conta as suas potenciais aplicações em medicina regenerativa, como estruturas que proporcionam integridade aos tecidos. Podem ter como objetivo a liberação controlada de fármacos e proteínas, servindo também como adesivos ou de sistema protetor de material encapsulado (células, compostos bioativos, etc.) (Slaughter e col., 2009).

Colagénio tipo I extraído de peles do tubarão *Scyliorhinus canícula*, utilizando ácido acético 0'5 M (Fernandes-Silva e col., 2013), foi utilizado na preparação de estruturas porosas através da tecnologia de liofilização. Estas estruturas foram posteriormente reticuladas com genipina (um reticulante natural que se tem mostrado eficaz, além de apresentar baixa

toxicidade), proporcionando-lhes estabilidade. Quando a reticulação é realizada através de CO_2 denso a 54 bar e à temperatura ambiente durante 16h, obtém-se um hidrogel poroso (Figura 9).

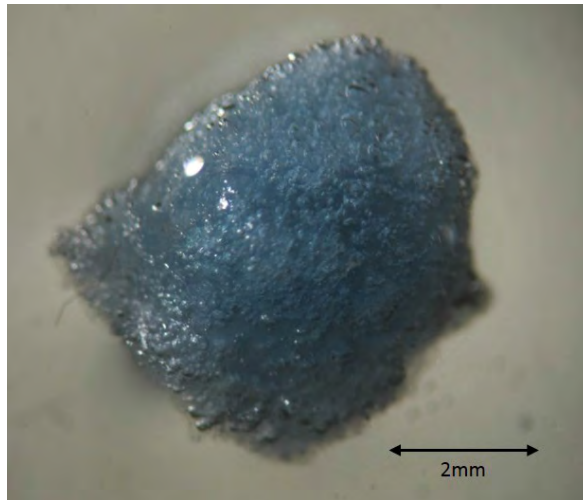


Figura 9. Hidrogel de colagénio marinho tipo I reticulado com genipina 0'1%, à temperatura ambiente, em CO_2 pressurizado a 54 bar, durante 16 horas.

Foi avaliado o seu potencial para utilização em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, em particular para a regeneração da cartilagem. Estes hidrogéis porosos apresentam propriedades mecânicas adequadas à aplicação prevista, com um aumento do módulo de compressão da estrutura de 46'3 kPa para 57'3 kPa com a reticulação a 25% (relativamente às aminas livres). A morfologia das estruturas reticuladas foi caracterizada através de microscopia eletrónica de varrimento (SEM) e microtomografia computadorizada de Raios-X (μ -CT), apresentando um tamanho médio de poro de 98 μm , com uma porosidade de 79% e interconectividade de 76%. No que diz respeito à avaliação do seu desempenho biológico, foram colocadas células ATDC5 (linha celular de condrócitos) em contacto direto com as estruturas de colagénio reticuladas, mostrando um aumento de atividade metabólica das células, assim como um aumento de dsDNA ao longo do tempo de cultura, demonstrando assim a viabilidade das células, que se encontram em proliferação (Fernandes-Silva e col., 2013).

3.3. *Scaffolds* para liofilização

Em engenharia de tecidos, são utilizados diferentes materiais e tecnologias para a produção de estruturas porosas com uma gama alargada de propriedades, procurando atender aos requisitos específicos da aplicação em vista. Uma das tecnologias usadas com frequência para a produção de biomateriais porosos é a técnica de liofilização. Para utilizar esta técnica, prepara-se uma solução polimérica com uma dada concentração, que é congelada em moldes com a dimensão e forma desejadas, consoante a aplicação pretendida. Congelar a solução origina a formação de cristais de gelo que, por sublimação durante o processo de liofilização, darão origem à porosidade da estrutura. Estes cristais de gelo serão tanto menores quanto mais rápido for o processo de congelação (Reys e col., 2013). Na preparação de estruturas porosas para aplicação em engenharia de tecidos e medicina regenerativa é essencial a existência de porosidade na estrutura, com poros de dimensão adequada à proliferação celular, e elevada interconectividade entre os poros, que permita a migração celular para o interior da estrutura, bem como o respetivo fluxo de nutrientes, oxigénio e produtos de excreção (Hutmacher, 2001).

O colagénio é um dos polímeros mais utilizados em engenharia de tecidos sendo, nessa perspetiva, importante elucidar a aplicação desta técnica de preparação de biomateriais, através de alguns exemplos de utilização de colagénio marinho.

Num trabalho recente, Moreira-Silva e colegas solubilizaram colagénio previamente extraído a partir de peles do tubarão *Scyliorhinus canícula* (isolado como descrito por Fernandes-Silva e colegas (Fernandes-Silva e col., 2013)) em ácido acético 0'5 M a uma concentração de 4% e promoveram a sua reticulação *in situ* na presença de genipina 10 mM, durante 2 horas. Esta solução foi colocada em placas de 96 poços, congelada a -80 °C e liofilizada, obtendo-se estruturas porosas estáveis. Por forma a avaliar a sua possível utilização na regeneração da cartilagem, estas estruturas foram caracterizadas utilizando diferentes técnicas. Foi realizada uma Análise Mecânica Dinâmica (DMA) às estruturas húmidas, em PBS a 37 °C, sendo que em frequências mais elevadas o material demonstrou boas propriedades de amortecimento, sugerindo bom comportamento viscoelástico. A capacidade das estruturas reticuladas de reterem água foi também avaliada em PBS (a pH 7'4 e 37 °C), mostrando que

estas são capazes de reter até 7 vezes a sua massa inicial. A caracterização morfológica das estruturas foi feita através de SEM e μ -CT, apresentando um tamanho de poro entre 150 e 200 μ m, com uma porosidade total de 66% (Figura 10). A proliferação celular foi também avaliada com células ATDC5, sendo possível observar um aumento da quantidade de dsDNA em função do tempo de cultura, demonstrando assim a ocorrência de proliferação celular, o que é suportado pelas observações feitas através de SEM ao longo dos dias de cultura (Figura 11).

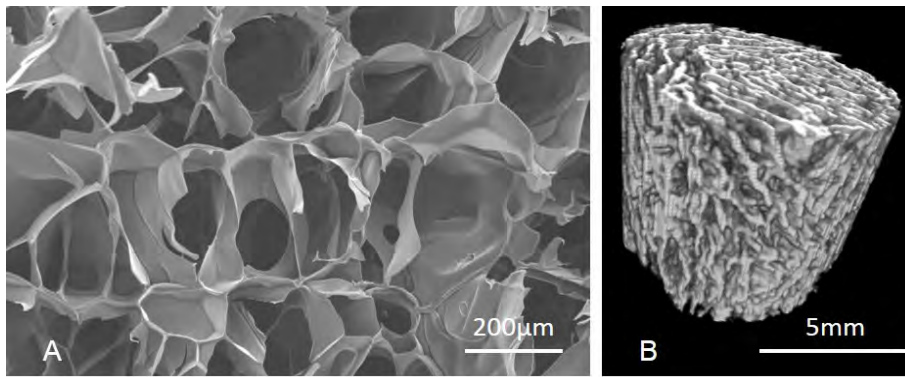


Figura 10. A) Imagem de SEM e B) μ -CT de estruturas porosas de colagénio marinho reticuladas com genipina e produzidas por liofilização.

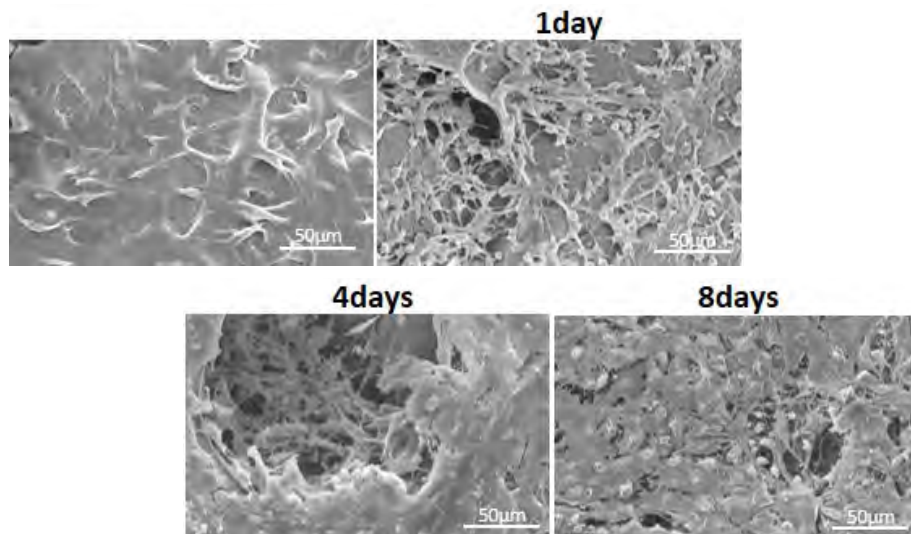


Figura 11. Imagens de SEM de células ATDC5 cultivadas em estruturas de colagénio marinho reticuladas com genipina, obtidas ao longo de oito dias de cultura celular.

Estruturas porosas podem ser produzidas utilizando colagénio marinho, como referido no exemplo anterior, mas estas podem também ser obtidas a partir da combinação de 2 ou mais polímeros naturais de origem marinha. Neste sentido, para a regeneração da mucosa oral, Terada e colegas produziram estruturas porosas através da mistura de quitosano e colagénio marinho isolado de escamas de tilápia (Terada e col., 2012). Estas estruturas foram preparadas por liofilização: a uma mistura de quitosano:colagénio (v/v) de iguais volumes de solução de quitosano (0'8%, w/v) e colagénio (1%, w/v) foi adicionado carbonato de sódio com hidrogenocarbonato de sódio (30 mmol/L), sendo esta solução colocada em moldes de forma a gelificar com a morfologia adequada. Após desidratação com etanol e liofilização, seguidos por um tratamento desidrotérmico (130 °C, a baixa pressão, durante 24h), obtiveram-se estruturas porosas com propriedades mecânicas e porosidade adequadas à aplicação na regeneração da mucosa oral.

3.4. Compósitos com hidroxiapatite

3.4.1. Biomateriais baseados em fosfatos de cálcio

A importância dos fosfatos de cálcio na área da medicina regenerativa, particularmente nas aplicações na medicina ortopédica, dentária e cirurgia traumática, tem justificado o elevado número de estudos científicos e consequentes publicações.

Na natureza existem diversas formas de fosfatos de cálcio com diferentes fins, dependendo das suas propriedades (Tabela 1). No entanto, apesar das diversas aplicações que os fosfatos de cálcio podem assumir, existe um especial interesse em estudar as suas aplicações na regeneração de tecidos duros, incluindo cicatrização de defeitos ósseos, tratamento de fraturas, aumento ósseo, reconstrução crânio-maxilo-facial, coluna vertebral, otorrinolaringologia, oftalmologia, assim como para o desenvolvimento de produtos para fins dentários e periodontais (Dorozhkin, 2013).

O osso é um tecido metabolicamente ativo constituído por água, células e matriz óssea, responsável pelo suporte de todo o corpo. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica (35%) constituída maioritariamente por colagénio e proteoglicanos e uma parte inorgânica (65%) constituída

maioritariamente por cristais de fosfatos de cálcio, especificamente hidroxiapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]. Ambas as partes, orgânica e inorgânica, são importantes para manter a flexibilidade e resistência à compressão, respetivamente (Seeley e col., 2008). No entanto, uma ampla gama de lesões pode levar à perda das funcionalidades deste tecido.

Tabela 1. Fosfatos de cálcio de acordo com rácio entre Ca:P (Vallet-Regí, 2001, Akram e col., 2014).

Designação	Abreviatura	Fórmula Química	Rácio Ca:P
Fosfato tetracálcico	PTCa	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2'0
Hidroxiapatite	HA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1'67
Fluoroapatite	FP	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1'67
Fosfato tricálcico (α, β, γ)	FTCa	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1'50
Fosfato octacálcico	FOCa	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1'33
Hidrogenofosfato de cálcio dihidratado	FDCaDH	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1'0
Hidrogenofosfato de cálcio	FDCa	CaHPO_4	1'0
Pirofosfato de cálcio	FCa	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1'0
Pirofosfato de cálcio dihidratado	PFCaDH	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1'0
Fosfato heptacálcico	FCaHP	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0'7
dihidrogenofosfato tetracálcico	FTCaDA	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0'67
Dihidrogenofosfato de cálcio monohidratado	FCaMH	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0'5
Metafosfato de cálcio (α, β, γ)	MFCa	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0'5

Neste contexto, a hidroxiapatite surge como um dos fosfatos de cálcio mais estudados e procurados para este tipo de lesões. A escolha da hidroxiapatite como biomaterial para aplicações biomédicas deve-se não só à referida semelhança com a composição nativa do tecido ósseo, mas também às suas excelentes propriedades de biocompatibilidade, osteocondutividade e osteointegração, promovendo a adesão e

proliferação celular (Vallet-Regí, 2001). No entanto, apesar das excelentes propriedades biológicas, a hidroxiapatite apresenta fracas propriedades mecânicas, que podem variar dependendo da sua origem.

A hidroxiapatite pode ser sintetizada ou extraída de diversas fontes, desde ossos de mamíferos, espinhas de peixe, plantas, entre outros (Akram e col., 2014). Contudo, o método de extração e a respetiva eficiência vão depender da fonte, da acessibilidade dos fosfatos de cálcio nessa fonte, bem como o seu teor mineral (Akram e col., 2014). Também o método de extração utilizado vai afetar as suas propriedades, como o tamanho de partícula, morfologia, estequiometria, estabilidade térmica e presença de iões. Enquanto a hidroxiapatite do osso nativo, bem como a hidroxiapatite obtida a partir de mamíferos e alguns compostos marinhos já testados não é estequiométrica, devido à presença de determinados iões (como magnésio, silício ou outros), a hidroxiapatite sintética é estequiométrica. Além disso, a hidroxiapatite obtida a partir de mamíferos ou peixes apresenta um perfil mais puro ao contrário da obtida a partir de recursos biogénicos ou plantas, que são mais instáveis, devido ao processo incompleto de conversão dos precursores da hidroxiapatite (Akram e col., 2014). Deste modo, as fontes marinhas têm-se tornado excelentes candidatos para a extração de hidroxiapatite, já que embora ainda que existam algumas limitações e diferenças consoante a sua origem, os resultados obtidos até ao momento com os diversos fosfatos de cálcio são bastantes promissores, como são exemplo disso, aliás, outros capítulos deste livro.

3.4.2. Aplicações

A hidroxiapatite está disponível em diversos estados físicos, geralmente em pó, grânulos ou partículas de várias dimensões. É geralmente combinada com outros biomateriais, maioritariamente com polímeros, uma vez que estes conferem propriedades, como a elasticidade, que a hidroxiapatite não tem e que é necessária para a mimetização do tecido a regenerar (Liu e Ma, 2004). Existem vários estudos que combinam hidroxiapatite com diversos polímeros, tais como: gelatina (Chang e col., 2003), quitosano (Ang e col., 2002), colagénio (Wahl e col., 2007), ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA) (Kim e col., 2007), ácido poliláctico (PLA) (Woo e col., 2007), entre outros, para a produção de diversos biomateriais. Destas combinações resultaram microsferas (Li e col., 2010), membranas (Madhumathi e col.,

2009), nanotubos (Chandanshive e col., 2013), hidrogéis, estruturas tridimensionais (3D) (Wahl e col., 2007) ou até mesmo revestimentos, visando aplicação na regeneração de tecidos (Figura 12).



Figura 12. Esquema ilustrativo da diversidade de aplicações da hidroxiapatite.

Com o objetivo de atender às necessidades do paciente, existe cada vez mais uma exploração intensiva de novas técnicas e métodos de produção. A progressão nas técnicas de fabricação tem promovido o desenvolvimento de estruturas com elevado nível de complexidade. Como fruto da intensa investigação, resultam bastantes produtos atualmente já registados e/ou até mesmo comercializados, que se encontram listados no trabalho de Dorozhkin (2013).

Apesar dos resultados já obtidos com hidroxiapatite serem bastante promissores e uma boa alternativa a muitos materiais, ao que se soma a vasta gama de produtos já disponíveis no mercado, a busca incessante por soluções cada vez mais próximas do que seria ideal leva muitos estudos a introduzir novas fontes naturais para obtenção de hidroxiapatite e outros fosfatos de cálcio.

3.4.3. Fontes marinhas

Fonte marinhas, especificamente resíduos e subprodutos de peixe, têm ganho especial interesse para aplicações biomédicas. Anualmente, uma elevada quantidade de subprodutos marinhos, como espinhas, cabeças, peles, vísceras e caudas são originadas no processamento de peixe, sendo direcionadas fundamentalmente para produção de alimento animal e fertilizantes (Kim e Mendis, 2006, Ferraro e col., 2010). No entanto, estes subprodutos provenientes da indústria pesqueira contêm uma grande quantidade de proteínas estruturais (entre outros compostos), com potencial interesse para diferentes aplicações industriais, particularmente na área da engenharia de tecidos. Deste modo, a extração de compostos a partir de fontes marinhas tem-se tornado cada vez mais alvo de estudo. Geralmente, são utilizadas peles e músculos de peixe para a extração de colagénio e gelatinas e espinhas de peixe para extrair cálcio para incorporação em diferentes produtos dietéticos com destino a organismos com défice nos níveis deste ião. Recentemente, as espinhas têm servido também como tentativa para a extração de fosfatos de cálcio, tendo sido já alcançados resultados consideráveis (Kim e Mendis, 2006). Além disso, a possibilidade de usar a mesma fonte para a extração de diferentes compostos torna-a altamente promissora e valiosa.

Outros capítulos deste livro abordam em detalhe a obtenção de fosfatos de cálcio de recursos marinhos, particularmente de espinhas de peixe, pelo que recomendamos ao leitor interessado em informação adicional a leitura desses capítulos.

3.4.4. Combinação de fosfatos de cálcio e colagénio marinho obtidos a partir da mesma fonte

Para corroborar a importância das espécies marinhas, testou-se a combinação de uma mistura de fosfatos de cálcio extraídos de dente de tubarão *Prionace glauca* com colagénio obtido a partir de pele da mesma fonte, para a produção de estruturas tridimensionais porosas para posterior utilização como suporte à cultura celular, numa ótica de engenharia de tecidos do osso. Os fosfatos de cálcio utilizados apresentam propriedades muito interessantes devido à presença significativa de flúor, correspondendo, ainda que parcialmente, a fluoroapatite.

Para a produção das estruturas solubilizou-se o colagénio (ASC) previamente extraído numa solução de ácido acético e adicionou-se à solução uma determinada quantidade de partículas de fosfatos de cálcio, de forma a obter diferentes formulações, variando o rácio entre as concentrações de fosfatos de cálcio e de ASC. Para reticular a mistura foram utilizados dois agentes de reticulação diferentes: etil(dimetilaminopropil)carbodiimida/N-hidroxissuccinimida (EDC/NHS) e HMDI. As estruturas foram produzidas pelo método de congelamento seguido por liofilização (Figura 13).



Figura 13. Esquema ilustrativo do processo de produção de estruturas porosas, composto de colagénio e fosfatos de cálcio, para aplicação em engenharia de tecidos.

As estruturas compostas produzidas revelaram-se estáveis e bioativas (Figura 14A), sendo capazes de promover a adesão e a proliferação celular (Figura 14B), tornando-as numa boa aposta para aplicações futuras no que diz respeito á regeneração de tecidos do osso.

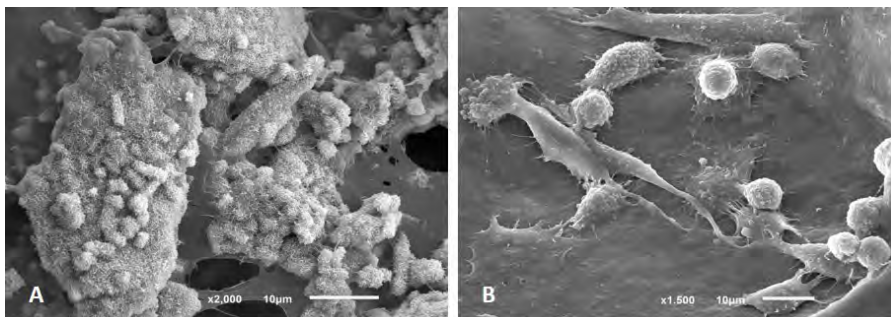


Figura 14. Imagens de SEM ilustrando os ensaios de avaliação de bioactividade e citotoxicidade das estruturas compostas de fosfatos de cálcio e colagénio de tubarão.

4. Considerações finais

O colagénio tem um largo espectro de aplicações em áreas diretamente relacionadas com a saúde, como cosmética, farmacêutica ou cuidados de saúde, e também na indústria alimentar como aditivo ou nutracêutico. Normalmente extraído de fontes bovinas e porcinas, o consumo deste colagénio poderá ter alguns constrangimentos a nível de saúde, como transmissão de doenças (como a BSE, encefalopatia espongiforme bovina, conhecida como doença das vacas loucas) ou devido a crenças religiosas, restringindo assim o consumo ou utilização da proteína obtida destas fontes. Embora dispendiosa, a produção de colagénio através de tecnologia recombinante é uma alternativa, através do uso de leveduras modificadas geneticamente de modo a expressarem a proteína desejada. Contudo é necessária tecnologia avançada e recursos elevados, o que tem limitado significativamente a sua exploração comercial.

Assim, conciliando uma fonte natural, abundante e pouco explorada, os recursos marinhos, nomeadamente as peles de peixes não aproveitadas, tornam-se numa fonte ideal para a extração de colagénio marinho onde este se torna, por sua vez, numa alternativa de grande valor ao colagénio comercializado atualmente. De facto, os colagénios podem ser extraídos de diversas fontes marinhas, como medusas, esponjas marinhas, pepinos-do-mar, cefalópodes e várias espécies de peixes, mas a utilização de um subproduto parece apresentar vantagens adicionais, por corresponder a uma valorização desse subproduto e assim de todo o recurso, contribuindo para uma exploração mais sustentável dos recursos marinhos.

O colagénio obtido de diversas fontes marinhas tem sido também proposto para aplicação biomédica, nomeadamente como membranas, géis e matrizes porosas para engenharia de tecidos (osso, cartilagem, mucosa oral, pele) ou para tratamento da pele, com resultados promissores.

Para que seja possível avançar, é agora fundamental que o volume de resultados cresça e se torne mais sólido, nomeadamente com validação em ensaios em modelos animais e mesmo em ensaios clínicos, que mostrem claramente a eficácia das tecnologias e produtos propostos.

Por outro lado, é também fundamental trabalhar na caracterização e validação do colagénio de fontes marinhas para aplicação na área

farmacêutica e médica, atendendo aos rigorosos e estreitos requisitos que essas áreas apresentam. Nesse aspeto em particular, há limitações críticas atuais para a utilização de subprodutos resultantes do processamento de peixe, que têm a ver com a sua classificação como tal e que impedem a sua utilização para fins humanos, sendo assim necessário ou um trabalho de reenquadramento legal ou de diferente tratamento desses materiais que são, na verdade, matérias-primas muito relevantes.

Do ponto de vista comercial, há ainda que contar com os concorrentes já estabelecidos, de origem bovina e porcina. Apesar das limitações referidas atrás, a sua produção dentro de rigoroso controlo de qualidade e direcionando-os para mercados apropriados, constituem produtos de excelente qualidade e assim barreiras naturais à entrada no mercado de outros produtos que não apresentem nenhuma característica fortemente diferenciadora.

Perspetiva-se assim um horizonte de vários anos até à entrada no mercado de biomateriais à base de colagénio marinho, mas tanto os cientistas como os médicos e farmacêuticos estão a trabalhar afincadamente para que isso seja uma realidade. E os pacientes precisam que essas soluções terapêuticas apareçam.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro do FEDER através do Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha Portugal 2007-2013 (POCTEP) no âmbito do projeto 0687_NOVOMAR_1_P. O apoio financeiro do Sétimo Programa Quadro de Investigação e Desenvolvimento da União Europeia, no âmbito do projeto REGPOT-CT2012-316331-POLARIS, e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito da bolsa de pós-doutoramento de JMS é também agradecido.

Referências bibliográficas

- Regulamento (UE) nº 1380. Jornal Oficial da União Europeia, Luxemburgo, 28 de dezembro de 2013.
- Akram M., Ahmed R., Shakir I., Ibrahim W. A. W., Hussain R. (2014) Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources. *Journal of Materials Science*, 49: 1461-1475.

- Ang T., Sultana F., Hutmacher D., Wong Y. S., Fuh J. e col. (2002) Fabrication of 3D chitosan–hydroxyapatite scaffolds using a robotic dispensing system. *Materials Science and Engineering C*, 20: 35-42.
- Badii F., Howell N. K. (2003) Elucidation of the effect of formaldehyde and lipids on frozen stored cod collagen by FT-Raman spectroscopy and differential scanning calorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 1440-1446.
- Bailey A. J., Paul R. G., Knott L. (1998) Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of Ageing and Development*, 106: 1-56.
- Benjakul S., Nalinanon S., Shahidi F. (2012) Fish collagen. Em: *Food biochemistry and food processing*, Simpson B. K. (ed.). Wiley-Blackwell, Oxford, Reino Unido. 365-387 p.
- Benjakul S., Thiansilakul Y., Visessanguan W., Roytrakul S., Kishimura H. e col. (2010) Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagens from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 132-138.
- Chandanshive B. B., Rai P., Rossi A. L., Ersen O., Khushalani D. (2013) Synthesis of hydroxyapatite nanotubes for biomedical applications. *Materials Science and Engineering C*, 33: 2981-2986.
- Chang M. C., Ko C. C., Douglas W. H. (2003) Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite. *Biomaterials*, 24: 2853-2862.
- Chasin M., Langer R. (1990) *Biodegradable polymers as drug delivery systems*. Marcel Dekker, Nova Iorque, EUA. 347 p.
- Dorozhkin S. V. (2013) Calcium orthophosphate-based bioceramics. *Materials*, 6: 3840-3942.
- Fernandes-Silva S., Moreira-Silva J., Silva T. H., Perez-Martin R. I., Sotelo C. G. e col. (2013) Porous hydrogels from shark skin collagen crosslinked under dense carbon dioxide atmosphere. *Macromolecular Bioscience*, 13: 1621-1631.
- Ferraro V., Cruz I. B., Jorge R. F., Malcata F. X., Pintado M. E. e col. (2010) Valorisation of natural extracts from marine source focused on marine by-products: a review. *Food Research International*, 43: 2221-2233.
- Foegeding E. A., Lanier T. C., Hultin H. O. (1996) Collagen. Em: *Food chemistry*, Fennema O. R. (ed.). Marcel Dekker Inc., New York, EUA. 902-906 p.
- Gómez-Guillén M. C., Giménez B., López-Caballero M. E., Montero M. P. (2011) Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: a review. *Food Hydrocolloids*, 25: 1813-1827.
- Gómez-Guillén M. C., Turnay J., Fernández-Díaz M. D., Ulmo N., Lizarbe M. A. e col. (2002) Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16: 25-34.
- Hashim P., Mohd-Ridzwan M. S., Bakar J., Mat-Hashim D. (2015) Collagen in food and beverage industries. *International Food Research Journal*, 22: 1-8.
- Horng J. C., Kotch F. W. e Raines R. T. (2007) Is glycine a surrogate for a D-amino acid in the collagen triple helix? *Protein Science* 16: 208-215.

- Hoyer B., Bernhardt A., Heinemann S., Stachel I., Meyer M. e col. (2012) Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 13: 1059-1066.
- Hutmacher D. W. (2001) Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues--state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 12: 107-124.
- Hwang J. H., Mizuta S., Yokoyama Y., Yoshinaka R. (2007) Purification and characterization of molecular species of collagen in the skin of skate (*Raja kenoei*). *Food Chemistry*, 100: 921-925.
- Jongjareonrak A., Rawdkuen S., Chaijan M., Benjakul S., Osako K. e col. (2010) Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). *LWT - Food Science and Technology*, 43: 161-165.
- Kim S. K., Mendis E. (2006) Bioactive compounds from marine processing byproducts – a review. *Food Research International*, 39: 383-393.
- Kim S. S., Ahn K. M., Park M. S., Lee J. H., Choi C. Y. e col. (2007) A poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffold with enhanced osteoconductivity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 80: 206-215.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Nagai T., Tanaka M. (2005) Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 89: 363-372.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Shahidi F. (2010a) Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *LWT-Food Science and Technology*, 43: 792-800.
- Kittiphattanabawon P., Benjakul S., Visessanguan W., Shahidi F. (2010b) Isolation and properties of acid- and pepsin-soluble collagen from the skin of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). *European Food Research and Technology*, 230: 475-483.
- Li G. Y., Fukunaga S., Takenouchi K., Nakamura F. (2005) Comparative study of the physiological properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate as cosmetic materials. *International Journal of Cosmetic Science*, 27: 101-106.
- Li L., Kommareddy K., Pilz C., Zhou C., Fratzl P. e col. (2010) In vitro bioactivity of bioresorbable porous polymeric scaffolds incorporating hydroxyapatite microspheres. *Acta Biomaterialia*, 6: 2525-2531.
- Liu D., Liang L., Regenstein J. M., Zhou P. (2012) Extraction and characterisation of pepsin-solubilised collagen from fins, scales, skins, bones and swim bladders of bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Food Chemistry*, 133: 1441-1448.
- Liu X., Ma P. X. (2004) Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32: 477-486.
- Lynn A. K., Yannas I. V., Bonfield W. (2004) Antigenicity and immunogenicity of collagen. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials*, 71: 343-354.

- Madhumathi K., Shalumon K., Rani V. D., Tamura H., Furuike T. e col. (2009) Wet chemical synthesis of chitosan hydrogel-hydroxyapatite composite membranes for tissue engineering applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 45: 12-15.
- Matmaroh K., Benjakul S., Prodpran T., Encarnacion A. B., Kishimura H. (2011) Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129: 1179-1186.
- Nagai N., Yunoki S., Suzuki T., Sakata M., Tajima K. e col. (2004) Application of cross-linked salmon atelocollagen to the scaffold of human periodontal ligament cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97: 389-394.
- Nagai T., Araki Y., Suzuki N. (2002) Collagen of the skin of ocellate puffer fish (*Takifugu rubripes*). *Food Chemistry*, 78: 173-177.
- Nagai T., Suzuki N. (2000) Isolation of collagen from fish waste material - skin, bone and fins. *Food Chemistry*, 68: 277-281.
- Nalinanon S., Benjakul S., Visessanguan W., Kishimura H. (2007) Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry*, 104: 593-601.
- Nam K. A., You S. G., Kim S. M. (2008) Molecular and physical characteristics of squid (*Todarodes pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. *Journal of Food Science*, 73: C249-255.
- Ranade V. V., Hollinger M. A., Cannon J. B. (2003) Drug delivery systems. Boca Ratón, Florida, EUA, CRC Press. 464 p.
- Regenstein J. M., Zhou P. (2006) Collagen and gelatin from marine by-products. Em: Maximising the value of marine by-products, Shahidi F. (ed.). Woodhead Publishing. 279-303 p.
- Reys L. L., Silva S. S., Oliveira J. M., Caridade S. G., Mano J. F. e col. (2013) Revealing the potential of squid chitosan-based structures for biomedical applications. *Biomedical Materials*, 8: 045002.
- Ricard-Blum S. (2011) The collagen family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3: a004978.
- Sadowska M., Kolodziejska I., Niecikowska C. (2003) Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chemistry*, 81: 257-262.
- Seeley R. R., Stephens T. D., Tate P. (2008) Anatomia & Fisiologia. Lusociência-Edições Técnicas e Científicas, Lda. 1280 p.
- Senaratne L. S., Park P. J., Kim S. K. (2006) Isolation and characterization of collagen from brown backed toadfish (*Lagocephalus gloveri*) skin. *Bioresource Technology*, 97: 191-197.
- Shigeru K., Masataka S. (1999) Characterization of fish type I collagen. Em: Extracellular matrix of fish and shellfish, Sato K., Sakaguchi M., Bremner H. A. (eds.). Research Signpost, India. 1-13 p.

- Sikorski Z. E. (1994) The Contents of proteins and other nitrogenous compounds in marine animals. Em: Seafood proteins, Sikorski Z. E., Pan B. S., Shahidi F. (eds.). Springer, US. 6-12 p.
- Singh P., Benjakul S., Maqsood S., Kishimura H. (2011) Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). Food Chemistry, 124: 97-105.
- Slaughter B. V., Khurshid S. S., Fisher O. Z., Khademhosseini A., Peppas N. A. (2009) Hydrogels in regenerative medicine. Advanced Materials, 21: 3307-3329.
- Song E., Kim S. Y., Chun T., Byun H. J., Lee Y. M. (2006) Collagen scaffolds derived from a marine source and their biocompatibility. Biomaterials, 27: 2951-2961.
- Sotelo C. G., Blanco M., Ramos Ariza P., Pérez-Martín R. (2015) Characterization of collagen from different discarded fish species of the West coast of the Iberian Peninsula. Journal of Aquatic Food Product Technology. *Submetido*.
- Terada M., Izumi K., Ohnuki H., Saito T., Kato H. e col. (2012) Construction and characterization of a tissue-engineered oral mucosa equivalent based on a chitosan-fish scale collagen composite. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 100: 1792-1802.
- Uchegbu I. F., Schatzlein A. G. (2006) Polymers in drug delivery. CRC Press. 280 p.
- Vallet-Regí M. (2001) Ceramics for medical applications. Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions. 97-108.
- Wahl D. A., Sachlos E., Liu C., Czernuszka J. T. (2007) Controlling the processing of collagen-hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 18: 201-209.
- Wang L., An X., Xin Z., Zhao L., Hu Q. (2007) Isolation and characterization of collagen from the skin of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). Journal of Food Science, 72: E450-455.
- Woo K. M., Seo J., Zhang R., Ma P. X. (2007) Suppression of apoptosis by enhanced protein adsorption on polymer/hydroxyapatite composite scaffolds. Biomaterials, 28: 2622-2630.
- Zelechowska E., Sadowska M., Turk M. (2010) Isolation and some properties of collagen from the backbone of Baltic cod (*Gadus morhua*). Food Hydrocolloids, 24: 325-329.
- Zhang M., Liu W., Li G. (2009) Isolation and characterisation of collagens from the skin of largefin longbarbel catfish (*Mystus macropterus*). Food Chemistry, 115: 826-831.



Estrutura e propriedades do ulvano, um polissacarídeo sulfatado de origem marinha

David A. Learmonth^{1,2,3}, Cristina Correia¹, Ana Gertrudes¹, Rui A. Sousa^{1*} e Rui L. Reis^{1,2,3}

¹ Stematters, Biotecnologia e Medicina Regenerativa SA, Avepark - Parque de Ciência e Tecnologia, Zona Industrial da Gandra, 4805-017 Barco, Guimarães, Portugal.

² 3B's Research Group - Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Avepark - Parque de Ciência e Tecnologia, Zona Industrial da Gandra, 4805-017 Barco, Guimarães, Portugal.

³ ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.

*rasousa@stematters.com

Resumo

A exploração de algas marinhas para aplicações restritas à indústria alimentar e aplicações agrícolas pertence ao passado. Actualmente procura-se no mar novas substâncias químicas, dotadas de propriedades funcionais únicas, e com potenciais aplicações na indústria biotecnológica, farmacêutica e dermocosmética. Do conjunto de macroalgas verdes, a *Ulva* fornece o polissacarídeo ulvano com estrutura e propriedades incomuns. Destas propriedades destacam-se o elevado peso molecular, a solubilidade aquosa, actividades antioxidante e anticoagulante, entre outros especificamente detalhados neste capítulo. Adicionalmente, novas potenciais aplicações são endereçadas com base nas particulares características do ulvano.

1. Introdução

As macroalgas constituem um recurso natural prontamente disponível e renovável, dividindo-se em três grandes grupos: as algas castanhas, as algas vermelhas e as algas verdes. Destas, várias são as espécies que

podem ser encontradas na costa marítima da Península Ibérica, algumas já em exploração comercial. As algas marinhas representam uma biomassa altamente significativa cujo uso tem sido tradicionalmente limitado para alimentos e aplicações agrícolas. Além do seu valor intrínseco, as macroalgas marinhas apresentam valor adicional pelos compostos que delas são possíveis de extrair. Tem sido estabelecido que a biomassa de algas contém quantidades abundantes de polissacarídeos sulfatados estruturalmente diversos, vários dos quais têm atraído a atenção da comunidade científica nas áreas biomédicas, devido às suas propriedades físico-químicas promissoras e biocompatibilidade. Estes compostos podem constituir soluções de origem natural para vários produtos e processos em diversas indústrias, incluindo a biotecnológica, a farmacêutica e a dermocosmética.

Em cada grupo de algas é possível identificar diferentes polímeros de interesse económico, embora os mais explorados actualmente sejam extraídos de espécies de algas vermelhas e castanhas. Os polímeros com maior relevo do ponto de vista comercial são as carrageninas, extraídas a partir de algas vermelhas, e o alginato, extraído de algas castanhas. As carrageninas são polímeros lineares de elevado peso molecular, hidrosolúveis e sulfatados, cuja unidade de repetição contém galactose. O polímero existe em várias formas, sendo as mais conhecidas a kappa-carragenina (produto nº 1; com um grupo sulfatado), iota-carragenina (produto nº 2, com dois grupos sulfatados) e lambda-carragenina (produto nº 3, com três grupos sulfatados). As suas estruturas respectivas são apresentadas na Figura 1.

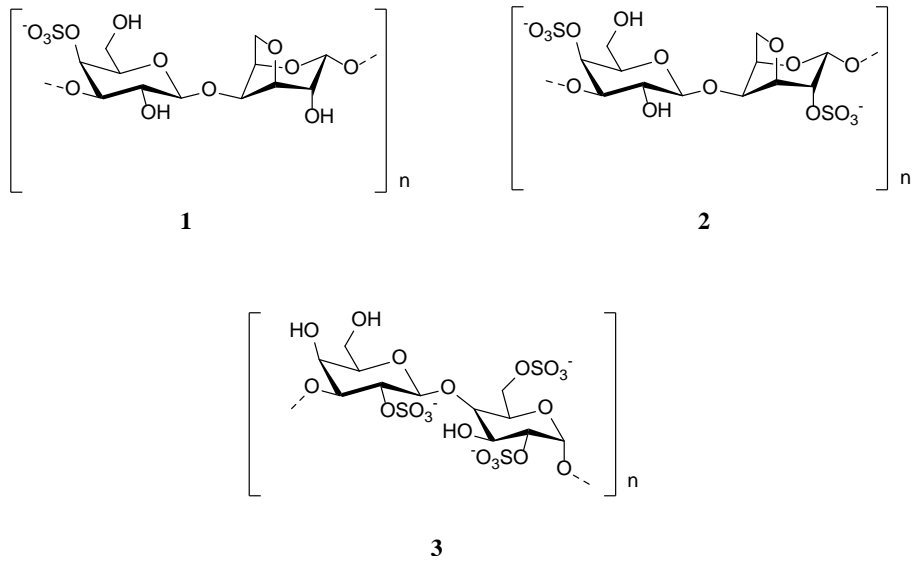


Figura 1. Estrutura química de κ - (1), ι - (2) e λ -carragenina (3).

No sector alimentar, o uso de carragenina é comum como gelificante e estabilizante, sendo encontrado em pudins e leites achocolatados, embora haja algum debate sobre possíveis efeitos negativos para a saúde humana. Porém, também é usado em lubrificantes, produtos de cosmética e como excipiente na indústria farmacêutica.

O alginato (produto nº 4) é um polímero aniónico, composto de ácido D-manurónico e L-gulurónico (Figura 2), apresentando-se com diferentes unidades de repetição. Devido à sua impressionante capacidade de absorver água e à sua biocompatibilidade, o alginato tem diversos usos na indústria farmacêutica e cosmética como excipiente. Exemplos concretos são o seu uso como elemento de compressas para queimaduras enquanto facilitador de cicatrização, e distintamente o seu uso na tintura de têxteis.

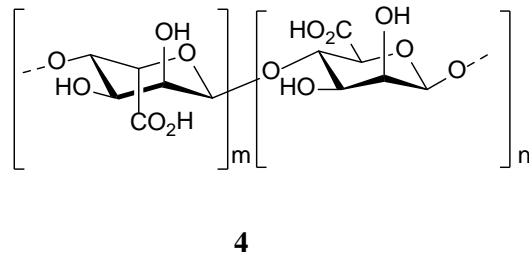
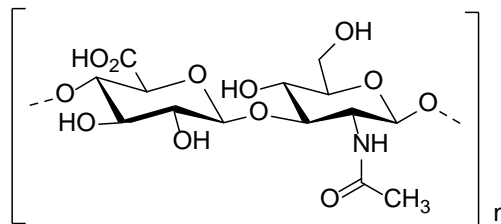


Figura 2. Uma das principais unidades de repetição de alginato (4).

Para além dos compostos descritos, as macroalgas constituem fonte de muitos outros compostos ainda com baixa expressão comercial, assim como alvo de intensa investigação na expectativa de se encontrarem novas soluções para aplicações médicas e industriais.

Do ponto de vista da exploração tecnológica e científica do mar, tem crescido o interesse pelas moléculas naturais, compatíveis com a saúde humana e de origem não-animal que este pode oferecer. Em vários sectores de elevado valor económico, como a farmacêutica e a cosmética, tem-se vindo a assistir à substituição gradual de moléculas sintéticas por alternativas naturais quando essas estão disponíveis em quantidade e pureza adequada. Paralelamente, o uso de moléculas naturais de origem animal levanta questões relativas a reacções imunitárias e cruzamento de doenças entre espécies, bem como as questões éticas associadas. Um exemplo comum do uso de moléculas naturais de origem animal não-humana é o glicosaminoglicano ácido hialurónico (produto nº 5) (Figura 3), extraído da crista de galo. O ácido hialurónico é composto por uma unidade de repetição dissacarídea de ácido glucurónico e *N*-acetilglucosamina. Este glicosaminoglicano é um dos principais componentes do líquido sinovial presente nas articulações e da matriz extracelular da cartilagem articular.



5

Figura 3. Estrutura química do ácido hialurónico (5).

As soluções aquosas de ácido hialurónico são bastante viscosas sendo por isso utilizadas com frequência como injeções intra-articulares em doenças músculo-esqueléticas, tal como, por exemplo, a osteoartrite. Porém, o efeito terapêutico do ácido hialurónico é de relativa curta duração devido à acção da enzima hialuronidase presente nas articulações, degradando extensivamente a cadeia do polímero, levando à eficácia clínica limitada. Consequentemente, múltiplas injeções de ácido hialurónico são

necessárias ao longo do tempo, a fim de manter níveis aceitáveis de ácido hialurônico no local de ação e permitir alívio sustentado da dor.

Além do exposto, os compostos naturais de origem marinha têm também revelado características físico-químicas nativas e propriedades biológicas intrínsecas com benefícios para o campo da saúde e bem-estar humano. Exemplos disso mesmo são os polissacarídeos sulfatados que podem ser extraídos das algas marinhas. Os polissacarídeos sulfatados mais comuns são as já referidas carrageninas das algas vermelhas, o fucoidan (produto nº 6) (Figura 4) das algas castanhas, bem como o ulvano das algas verdes (*Chemical Abstracts Service* numero de registro: 164252-34-0). A laminarina (produto nº 7), também obtida das algas castanhas, não é naturalmente sulfatada, mas pode ser transformada por via de síntese química.

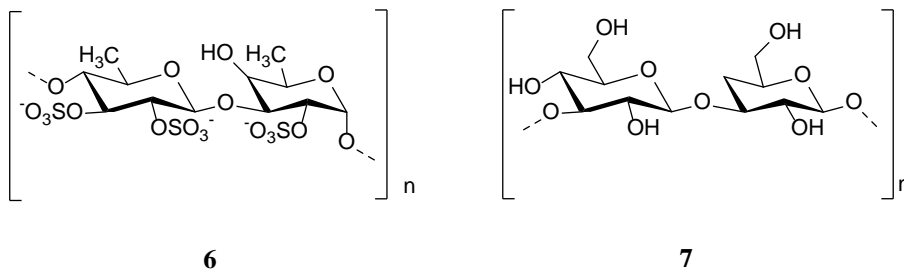


Figura 4. Estrutura química de fucoidan (6) e laminarina (7).

As características destes compostos (grau de sulfatação, peso molecular, polidispersão, solubilidade aquosa, entre outras) variam de acordo com a espécie de alga e o método de extracção usado. De entre estes polissacarídeos sulfatados, historicamente o menos explorado tem sido claramente o ulvano, tendo-se notado um aumento na publicação científica sobre este composto particularmente ao longo da última década. Contudo, o ulvano pela sua estrutura apresenta particularidades que lhe conferem interesse único. Além da sulfatação, e de acordo com estudos de caracterização de há mais que cinquenta anos (Brading e col., 1954, McKinnel e Percival, 1962), a estrutura do ulvano é distinguida maioritariamente pelos monossacarídeos de ácido glucurónico e ácido idurónico na unidade de repetição aldobiourónica, formando o polímero uma cadeia linear sem evidências de ramificação significativa. Os ácidos urónicos estão presentes em várias moléculas de origem animal, sendo

raros e não são fáceis de obter de outras fontes. Não obstante, o ulvano é constituído também por outros monossacarídeos, tal como por exemplo, ramnose e xilose, consoante a sua proveniência. Assim sendo, o ulvano pode conter uma unidade de repetição consistindo de dois monómeros seleccionados a partir de ramnose, xilose, ácido glucurónico e ácido idurónico. As possíveis unidades de repetição dissacarídeo do ulvano incluem, pelo menos, sulfato de ramnose-ácido glucurónico, sulfato de ramnose-ácido idurónico, sulfato de ramnose-xilose ou sulfato de ramnose-sulfato de xilose, conforme apresentadas na Figura 5:

1. tipo A3S [β -D-ácido glucurónico-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnose 3-sulfato-1 \rightarrow] (produto nº 8)
2. tipo B3S [α -L-ácido idurónico-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnose 3-sulfato-1 \rightarrow] (nº 9)
3. tipo U3S [β -D-xilose-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnose 3-sulfato-1 \rightarrow] (nº 10)
4. tipo U2'S3S [β -D-xilose 2-sulfato-(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnose 3-sulfato-1 \rightarrow] (nº 11)

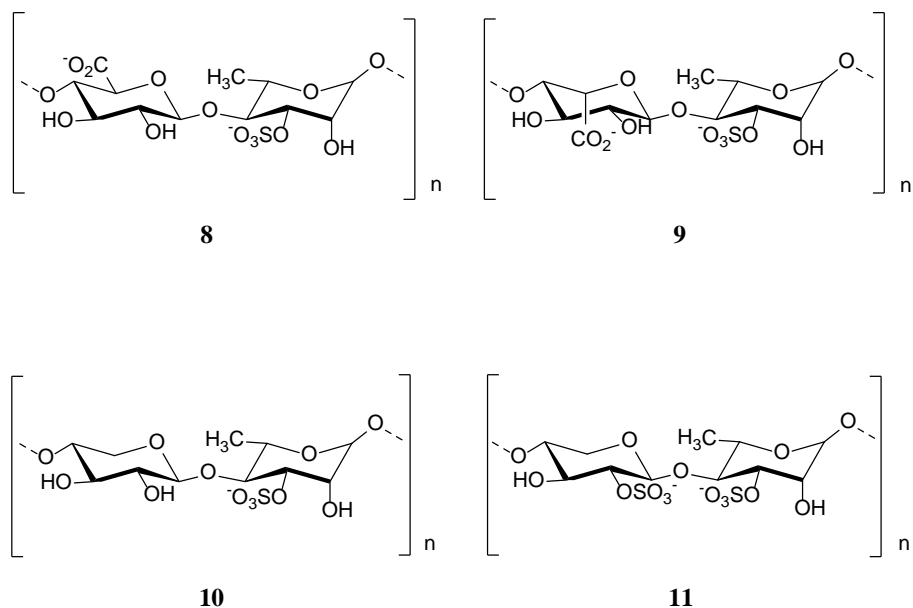
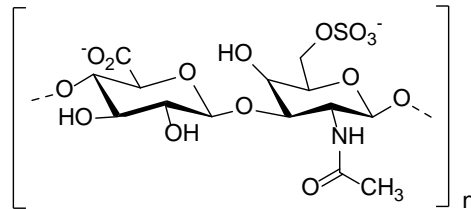


Figura 5. Quatro possíveis unidades de repetição dissacarídeo do ulvano.

A combinação única de ácidos urónicos e grupos sulfato numa estrutura é característica de glicosaminoglicanos, exemplos dos quais incluem o sul-

fato de condroitina (produto nº 12) e a heparina (nº 13) (Figura 6), uma classe de moléculas heterogénea com funções essenciais para as células humanas. Esta semelhança estrutural aumenta o interesse no polissacarídeo sulfatado ulvano como composto promissor para desenvolvimento de novas abordagens na área da saúde humana.



12

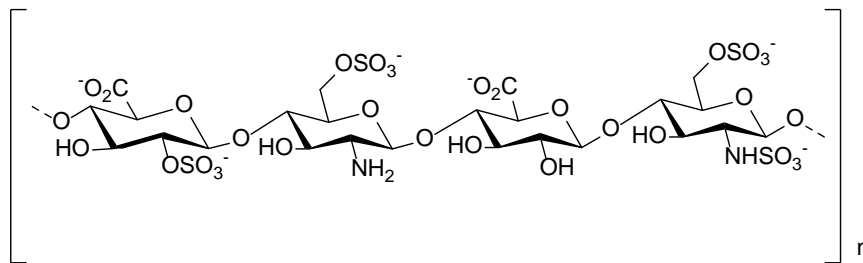


Figura 6. Estruturas químicas de sulfato de condroitina (12) e heparina (13).

2. Ulva

Macroalgas verdes da classe *Ulvophyceae* e do género *Ulva* encontram-se disseminadas por todo o mundo, incluindo as costas marítimas ibéricas. As espécies deste género são usadas como fonte de biomassa e para alimentação, sendo vulgarmente denominada de alface-do-mar. Têm elevada taxa de crescimento em águas ricas em azoto, mas as suas características também lhes permite sobreviver em condições adversas. Dada a sua abundância natural, a maior fonte de *Ulva* para o mercado é a colheita marítima directa. Em comparação com outras algas, o seu valor de mercado é baixo, mas com a evolução dos seus usos e aplicações, esta tendência pode mudar. Avanços têm sido feitos no desenvolvimento de sistemas integrados de aquacultura com *Ulva*, devido às vantagens que esta

oferece na manutenção da água, na alimentação animal e como produto adicional do sistema. A valorização da alga tem também progredido com o interesse no polissacarídeo ulvano. Encontram-se reportadas centenas de espécies de *Ulva*, sendo que as mais investigadas em relação ao polissacarídeo ulvano são *Ulva armoricana*, *Ulva compressa*, *Ulva lactuca*, *Ulva pertusa* e *Ulva rigida*. O ulvano encontra-se de forma estrutural na parede celular da alga, interagindo com proteínas e iões (Lahaye e Robic, 2007). As várias espécies de *Ulva* disponíveis e o polissacarídeo ulvano são certamente tesouros do mar com muito potencial ainda por explorar.

3. O ulvano

3.1 Extracção

O polissacarídeo ulvano é um dos constituintes da parede celular de várias espécies de *Ulva*. Estima-se que os polímeros da parede celular da alga representam uma percentagem bastante significativa da matéria seca da alga, na ordem dos 38 a 54% (Lahaye e Robic, 2007). Para além do ulvano, que é altamente solúvel em água mesmo à temperatura ambiente, encontram-se outros polímeros solúveis da parede celular da alga, tal como xiloglucanos, e outros insolúveis, por exemplo a celulose. Outros factores a ter em conta na extracção do ulvano são os pigmentos verdes característicos da alga, o seu elevado teor proteico, bem como os lípidos constituintes das membranas e parede celular. De forma simplificada, a extracção do polímero ulvano é composta, pelo menos, dos seguintes passos principais: (i) ruptura estrutural da parede celular; (ii) isolamento da fase aquosa contendo todas as moléculas solúveis; (iii) remoção de contaminantes, impurezas e outras substâncias não-desejadas (outros polímeros, pigmentos, proteínas e lípidos) (Alves e col., 2010). As características físico-químicas do polissacarídeo extraído, seu grau de pureza e o rendimento de processo podem variar consideravelmente com a espécie, condições de crescimento e armazenamento da alga, bem como com os métodos de extracção usados (por exemplo temperatura, pH, duração do processo, entre outros).

A ruptura da parede celular pode ser levada a cabo a partir da alga fresca, pelo seu congelamento, ou a partir da alga previamente desidratada.

Em qualquer dos casos, o passo seguinte é a fragmentação da alga para aumentar *significativamente* a área superficial de extracção. Os primeiros passos de tratamento da alga também podem ter impacto na qualidade do ulvano extraído (Robic e col., 2008). A extracção de ulvano é feita por meio aquoso (opcionalmente na presença de um catião divalente quelante, tal como oxalato de amónio), visto este ser solúvel em água, o que imediatamente elimina questões de contaminação por celulose. O meio aquoso pode ser simplesmente água destilada ou podem ser usadas soluções aquosas acidificadas, apesar destas poderem degradar parcialmente o polímero, reduzindo o seu peso molecular (Yaich e col., 2013). O rendimento do processo de extracção é favorecido pelo uso de temperaturas elevadas, sendo que estas podem também contribuir para a diminuição do peso molecular do polímero recolhido. O processo de extracção mais comum é a imersão em água com aquecimento e agitação, em geral a uma temperatura que varia entre os 65 °C e 90 °C. Está também reportada a extracção de ulvano com recurso a pressão pelo uso de um ciclo de autoclave a 125 °C durante quatro horas, contudo não existem dados sobre o peso molecular ou grau de sulfatação do composto extraído (Qi e col., 2012). Os métodos disponíveis para purificar o ulvano extraído são muito variados e direccionados para o tipo de contaminante que se deseja remover. Os métodos de purificação têm impacto sobre as características do ulvano obtido e o seu grau de pureza (Costa e col., 2012). A selecção dos passos de purificação deve ter em conta a aplicação final do ulvano e os requisitos associados. A título exemplificativo, o grau de pureza requerido para aplicações médicas é muito mais elevado de que para soluções nutracêuticas.

Enquanto pequenas variações ao processo de extracção podem afectar o ulvano do ponto de vista do seu peso molecular, polidispersão e grau de sulfatação, é igualmente verdade que questões relacionadas com a escolha da alga e as suas condições de cultura têm também grande relação com a unidade de repetição mais comum no ulvano extraído, bem como a natureza e teor de impurezas que acompanham a extracção (outros açúcares e proteínas). As diferenças encontradas no polissacarídeo ulvano quando extraído de diferentes espécies de *Ulva* e de diferentes colheitas mostram uma certa variabilidade em função das estações do ano (correntes, temperaturas, ciclo de vida, exposição solar) e da disponibilidade de alimento (Robic e col., 2009). Todos estes parâmetros

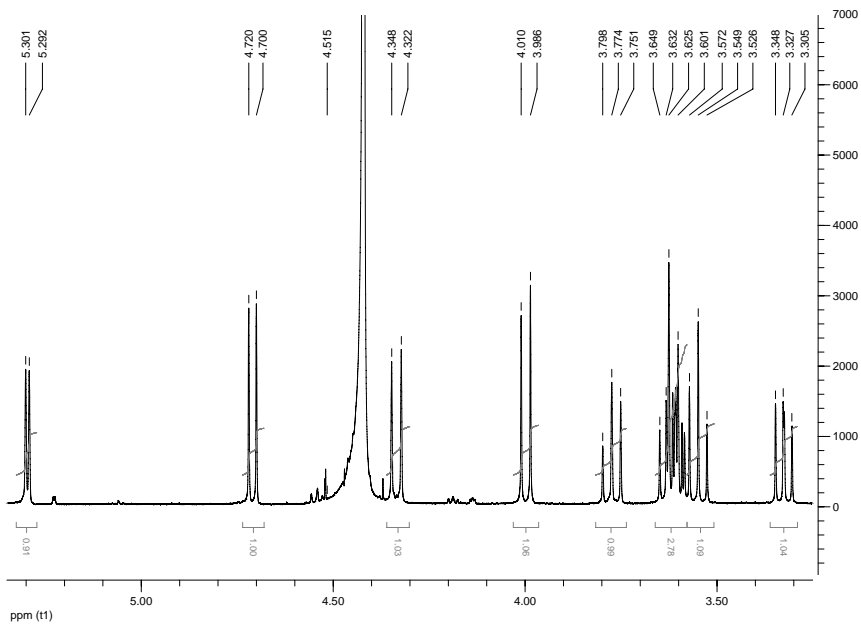
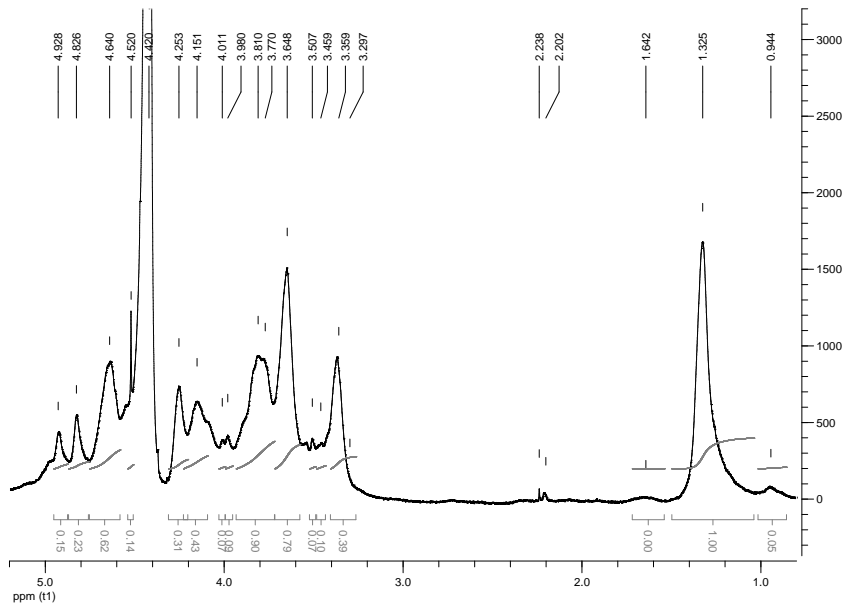
são factores de controlo importantes para garantir sempre consistência no processo de obtenção do ulvano. Contudo, os dados actualmente existentes não permitem ainda seleccionar de antemão determinadas espécies e condições de cultura, ou época de colheita, para obter ulvano com um definido conjunto de características, que possa cumprir com especificações pré-determinadas de forma consistente. A consolidação de uma fonte de alga que permita o controlo da espécie e época de colheita, associado a um processo de extracção reproduzível e preciso que possa ser validado irá aproximar o ulvano a aplicações concretas e com viabilidade de mercado.

3.2 Caracterização estrutural e propriedades físico-químicas

O polímero ulvano, extraído de algas de acordo com os processos anteriormente descritos, é finalmente isolado por liofilização (secagem por congelamento por vácuo) da solução de extracção purificada, fornecendo assim a substância na forma de um sólido amorfo, inodoro e ligeiramente higroscópico. O aspecto visual do ulvano assim isolado pode variar entre branco a castanho, dependendo da sua pureza. Ulvano é altamente solúvel em água à temperatura ambiente e pH neutro (>200 mg/mL) devido a sua natureza hidrofílica, mas é praticamente insolúvel em todos os meios orgânicos, incluindo até solventes apróticos polares, tais como o sulfóxido de dimetilo (DMSO), *N,N*-dimetilformamida (DMF) e *N*-metilpirrolidinona (NMP).

A estrutura química do ulvano pode ser convenientemente confirmada através de análise por ressonância magnética nuclear de protões (^1H RMN) em combinação com espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Como pode ser visto na Figura 7, o espectro de ^1H RMN de ulvano mostra claramente picos entre os 3'3 e 4'6 partes por milhão (ppm) que podem ser atribuídos aos açúcares de ácido glucurónico e ramnose, que constituem a principal unidade de repetição A3S. Particularmente distinguíveis são os picos do grupo metilo (CH_3) de ramnose aproximadamente aos 1'3 ppm e os protões anoméricos do ácido glucurónico e ramnose entre 4'8 e 5 ppm.

ESTRUTURA E PROPRIEDADES DO ULVANO, UM POLISSACARÍDEO SULFATADO...
 Valorização dos Recursos Marinhos Biomateriais em Regeneração de Tecidos



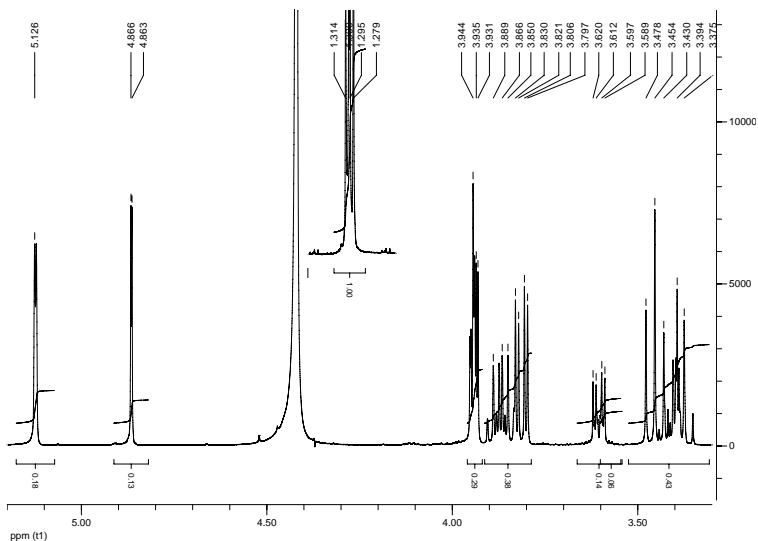


Figura 7. Espectros ^1H RMN de ulvano (superior), ácido glucurônico (meio) e ramnose (inferior), todos a 60 °C com concentração de 1% m/V em água deuterada (D_2O).

O espectro FTIR de ulvano, apresentado na Figura 8, exibe os principais picos de ulvano com boa resolução. Pode-se identificar claramente picos de acordo com os grupos hidroxilo periféricos, hidrocarbonetos alifáticos, ácido carboxílico e grupos sulfato. As atribuições dos picos são listadas na Tabela 1.

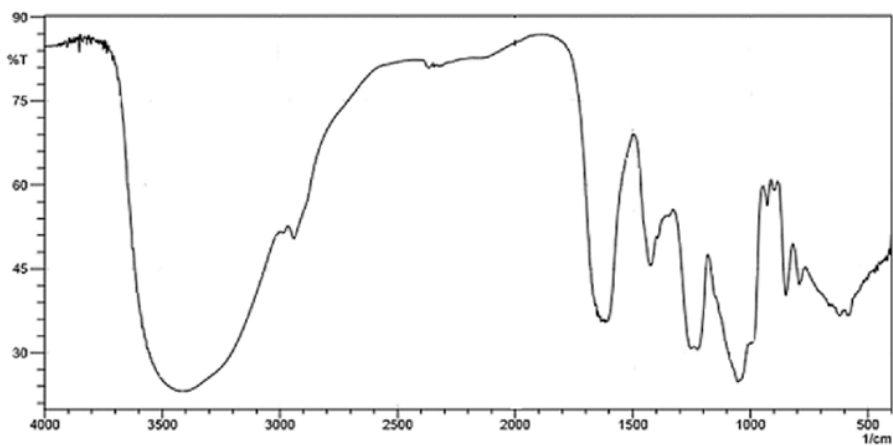


Figura 8. Espectro FTIR de ulvano (disco KBr)

Tabela 1. Atribuição dos principais picos de ulvano no espectro FTIR apresentada em Figura 8.

Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Grupo Funcional
3400	OH
2900	C-H
1650	CO ₂ H
1250	O-SO ₃
1000	CH-O-CH

Dependendo da sua utilização e se considerado desejável, a molécula de ulvano pode ser caracterizada por outras técnicas complementares. Por exemplo, o grau de sulfatação pode ser determinado por análise elementar por combustão da amostra. No caso de ulvano extraído de *Ulva lactuca*, o grau de sulfatação encontra-se habitualmente na ordem dos 4 a 5%. Outras características, tais como peso molecular médio, polidispersão e/ou viscosidade intrínseca podem ser avaliadas por uma técnica denominada cromatografia de permeação em gel/cromatografia de exclusão de tamanho. O peso molecular médio de ulvano é bastante variável, tipicamente entre 100 a 600 kDa e a sua polidispersão situa-se habitualmente entre 2 e 10, ou mais. Como o ulvano é um polímero de origem natural, deve ser esperado que o polissacarídeo contenha determinadas impurezas não-desejadas. Por exemplo, se as algas são recolhidas a partir de águas ricas em metais pesados, é provável que possam ser encontrados resíduos (partes por milhão, ppm) de chumbo, mercúrio e cádmio, entre outros metais pesados, através de análise por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado. Para além de ulvano, outras substâncias, tais como proteínas, podem ser solubilizados a partir das paredes celulares de *Ulva* e podem passar para o produto final. A quantificação de proteína total pode ser realizada por detecção colorimétrica baseado na redução de Cu²⁺ para Cu⁺ por proteínas, usando o ensaio de ácido bicinonínico (BCA). A redução de cobre em meio alcalino é detectada pelo produto de cor roxa, resultado da quelação de duas moléculas de ácido bicinonínico com iões Cu⁺. Por último, endotoxinas com origem na membrana exterior da parede celular de bactérias Gram-negativas podem estar presentes no extracto de ulvano, como em qualquer outro material de origem natural. Os níveis de

endotoxinas no ulvano podem ser determinados pelo teste LAL (lisado de amebócitos de *Limulus*) conforme descrito na Pharmacopeia Europeia (Ph. Eur. 2.6.14).

O ulvano possui uma forte capacidade de ligação a catiões e é capaz de se ligar a vários metais, incluindo metais pesados. É conhecido que o cádmio é capaz de deslocar o cálcio da parede celular da *Ulva lactuca*, e o ulvano tem uma afinidade muito maior para o cádmio do que para o cálcio (Lahaye e Robic, 2007). Tal como, também é sabido que o ulvano é responsável por fixar cobre na estrutura da alga *ulva americana* (Lahaye e Robic, 2007). Estes aspectos são altamente relevantes e devem ser mantidos em mente quando se considera ulvano para uso em aplicações medicinais ou biomédicas, até porque os níveis de metais tóxicos e metais pesados têm de ser estritamente controlados, pelo que essas impurezas não devem estar presentes a níveis acima de algumas partes por milhão. Assim, todos os lotes de ulvano para uso em tais aplicações devem ser rigorosamente testados para garantir que tais catiões não desejados não permanecem ligados ao polímero. Titulação acidométrica de ulvano isolado de *Ulva americana* confirmou afinidade para catiões na seguinte ordem; Al > Cu > Pb > Zn > Cd = Mn > Sr > Mg = Ca. No caso de catiões de cobre, o grau de quelação é controlado principalmente pelo teor em ácido idurónico.

Conforme referido anteriormente, o ulvano é altamente solúvel em água e em outros meios aquosos, mas tem tendência para formar soluções com viscosidades muito baixas. Foi reportada viscosidade mais baixa para ulvano extraído de *Ulva pertusa* a 120 °C em vez de 20-90 °C e este facto pode provavelmente ser explicado pela degradação do polissacarídeo a temperaturas mais elevadas (Yamamoto, 1980). Também tem sido relatado que processos de extracção diferentes, incluindo os métodos enzimáticos e químicos, podem ter um forte impacto sobre as propriedades reológicas de soluções de ulvano (Yaich e col., 2014).

O comportamento reológico de soluções de ulvano também tem sido estudado no que se refere ao efeito da velocidade de corte na viscosidade (Yaich e col., 2014, Shao e col., 2014). Os resultados mostram que a viscosidade de soluções de ulvano é dependente da taxa de corte. Em geral, as soluções de ulvano apresentam um comportamento ligeiramente pseudoplástico, visto que a viscosidade da solução tende a diminuir à medida que aumenta a taxa de corte, como apresentado na Figura 9.

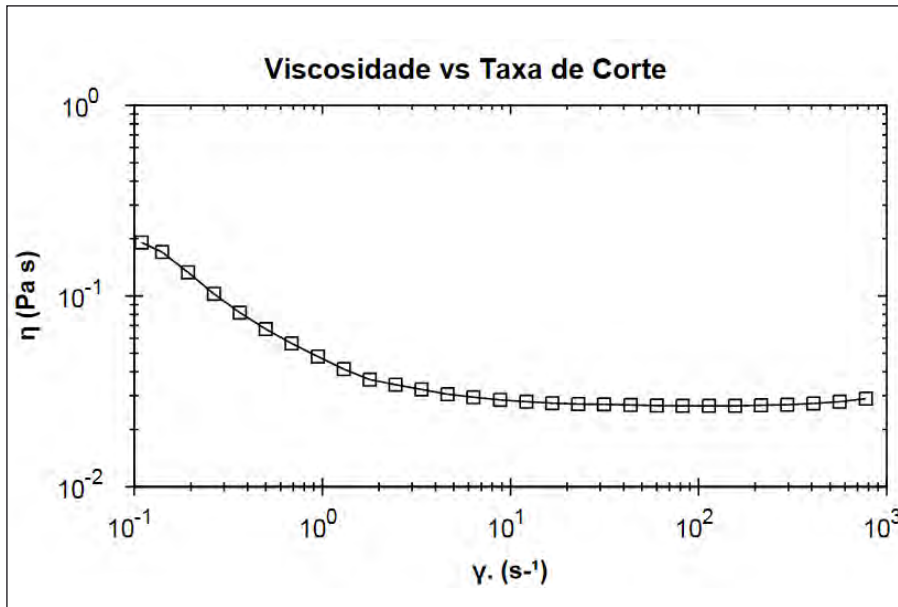


Figura 9. Comportamento do fluxo do ulvano dissolvido em água a uma concentração de 3% m/V.

3.3 Potenciais aplicações biomédicas

Para ser considerado adequado para aplicações biomédicas, tais como engenharia de tecidos e medicina regenerativa, é obrigatório que qualquer material seja biocompatível (não-citotóxico) e biodegradável ao longo do tempo. Uma vez que o material tenha exercido o efeito terapêutico desejado, o mesmo pode ser eficientemente removido pelo organismo sem dar origem a quaisquer produtos metabólicos ou produtos de degradação que possam exercer efeitos tóxicos.

Teoricamente, biomateriais obtidos a partir de fontes naturais, tais como plantas ou algas devem ter uma maior propensão para cumprir com estes critérios elementares.

Neste sentido, o ulvano parece posicionar-se como um polissacarídeo sulfatado estruturalmente único de origem não-animal. Não obstante, apesar de potencialmente cumprir com os critérios acima mencionados, o ulvano permanece praticamente inexplorado como um novo concorrente na área biomédica.

A formação de hidrogéis reticulados por forças físicas ocorre quando as cadeias poliméricas individuais são estabilizadas por forças fracas, tais como interacções electrostáticas e hidrofóbicas. É claro que tais interacções são fracas e facilmente quebradas por alterações nas condições físicas, tais como força iónica, pH da solução, temperatura ou por outras fontes de estresse. Normalmente hidrogéis formados sob tais condições são frágeis e inadequados para a maioria das aplicações. Além disso, hidrogéis baseados em polissacarídeos muitas vezes apresentam propriedades mecânicas deficientes, decorrentes da grande capacidade de absorção de água e inchamento, que resulta em estruturas de poros abertos e arquitectura débil. A presença de grupos polares, tais como grupos carboxilo e sulfato, leva a uma absorção de água ainda maior, reduzindo mais a possibilidade de obtenção de hidrogéis mecanicamente estáveis. Embora existam muitas estratégias para melhorar a estabilidade do hidrogéis, as mais comuns incluem a formação de redes intercaladas com polímeros de cargas opostas, a adição de aditivos inorgânicos e introdução de grupos funcionais quimicamente reactivos para permitir outras formas de reticulação mais permanentes.

O ulvano é um poli-electrólito aniónico, devido à presença de vários grupos carboxílicos e de sulfato nas unidades de ácido glucurónico e ramnose, respectivamente. Devido aos valores de pKa destes substituintes periféricos, ambos os resíduos existem principalmente no estado desprotonado, mesmo a pH neutro. A carga líquida de ulvano, por conseguinte, irá depender fortemente do pH e da força iónica do meio de solução. Surpreendentemente, para um polissacarídeo sulfatado com peso molecular relativamente elevado, o ulvano mostra uma tendência para formar géis frágeis, o que em parte pode ser devido a interacções electrostáticas desfavoráveis entre os grupos funcionais carregados da molécula, que impedem a formação de zonas de junção estáveis e uma conformação ordenada das cadeias do polímero. Neste aspecto, o comportamento do ulvano é muito diferente do de alginato por exemplo, o qual forma facilmente estruturas reticuladas através de gelificação por via ionotrópica na presença de catiões divalentes.

O mecanismo de formação de géis de ulvano não é totalmente compreendido, mas é conhecido que o ácido bórico, iões de cálcio e um pH ligeiramente básico (entre 7.5-8) são necessários para formar um gel

(Lahaye e Robic, 2007). As concentrações ótimas para a formação de um hidrogel de ulvano extraído de *Ulva armoricana* foram 15-33 mM de ácido bórico e de cerca de 7 mM de cálcio a pH 7'5. Concentrações mais altas de iões, maior ou menor pH e iões de tampão fosfato não foram eficazes. Além disso, ulvano na sua forma de sal de sódio não forma géis por adição de ácido bórico a pH 7'5, o que indica que a formação de um hidrogel de ulvano requer especificamente o cálcio ou um outro catião divalente.

O gel é termoreversível pelo que apenas ligações fracas estão envolvidas. Foi inicialmente sugerido (Huang, 1976) que um número limitado de ésteres de borato é formado através do grupo funcional cis-diol dos resíduos de ramnose não sulfatados, e que os catiões de cálcio poderiam formar complexos com, ou estabilizar os ésteres borónicos, tal como apresentado nas estruturas A e B (Figura 10). No entanto, evidência experimental a suportar essa teoria não foi encontrado por ^{11}B RMN, apesar de se tratar de uma técnica altamente sensível (Lahaye e col., 1998). Os autores postularam que isto pode ser devido à quantidade de modificação do éster borato se encontrar abaixo do limite de detecção por esse método. Alternativamente, a taxa de dissociação entre o ácido bórico de borato éster-ulvano /ulvano livre pode ser muito rápido na escala de tempo de espectroscopia de RMN ou que os espectros de ulvano livre e do complexo ulvano-borato são simplesmente indistinguíveis.

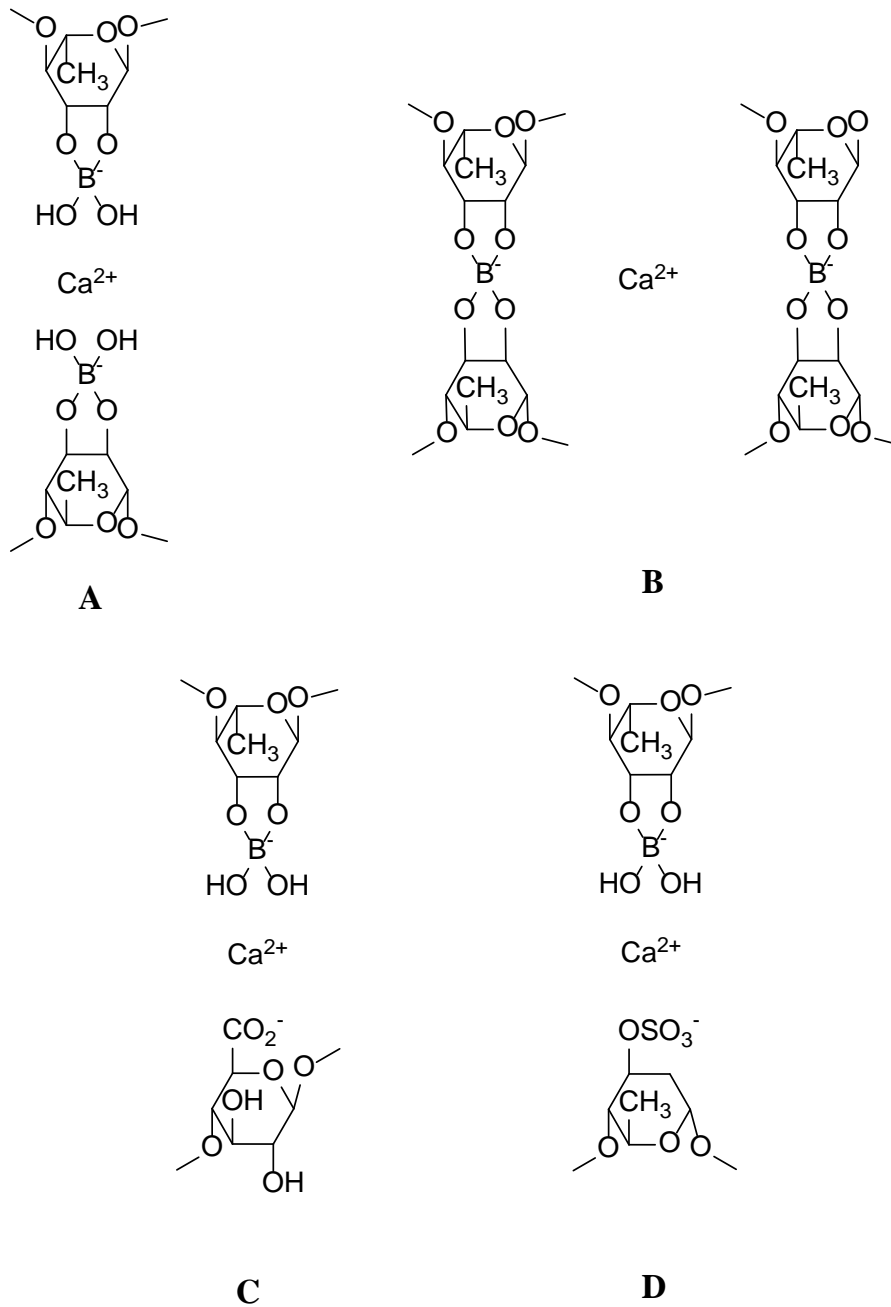


Figura 10. Possíveis interações de borato e cálcio na formação de hidrogéis de ulvano.

Mais tarde, foi ainda sugerido que os grupos sulfatos e carboxílicos também podiam coordenar-se ao catião de cálcio tal como apresentado em estruturas C e D (Figura 10), contribuindo assim para o mecanismo de gelificação (Lahaye e Axelos, 1993). De qualquer forma, o assunto é ainda controverso e precisa de melhor esclarecimento.

A solubilidade do ulvano é apreciável apenas em água devido à sua carga negativa e natureza hidrofílica. Esse facto limita a gama de reacções químicas possíveis sob condições aquosas e poderia influenciar negativamente a versatilidade do ulvano como uma plataforma para novos biomateriais adaptados especialmente para cada situação concreta, através de uma abordagem de modificação química dirigida. De grande interesse seria a descoberta de condições de reacção adequadas para modificações específicas dos grupos funcionais periféricos, nomeadamente os substituintes carboxilo e hidroxilo.

Hidrogéis podem ser quimicamente ou covalentemente reticulados e são considerados permanentes quando as zonas de junção entre as cadeias poliméricas são formadas por meio de ligações covalentes. Se as novas ligações não forem susceptíveis a clivagem através de mecanismos enzimáticos ou hidrolíticos, os hidrogéis são normalmente estáveis e resistentes à degradação. Até à data, tentativas para ultrapassar a instabilidade mecânica de hidrogéis de ulvano reticulados fisicamente têm-se centrado sobre modificações químicas. Estes focaram na introdução de substituintes não saturados (ou seja ligações duplas carbono-carbono, C = C) na cadeia de ulvano, que devem permitir a formação de hidrogéis mais fortes através de reticulação química promovida por luz visível ou ultravioleta (UV) na presença de um foto-iniciador apropriado.

Convenientemente, ulvano possui dois tipos de grupos funcionais reactivos, carboxilo e hidroxilo, ambos podem ser utilizados para introduzir, de forma quimiosselectiva, grupos metacrilato, como pode ser visto na Figura 11.

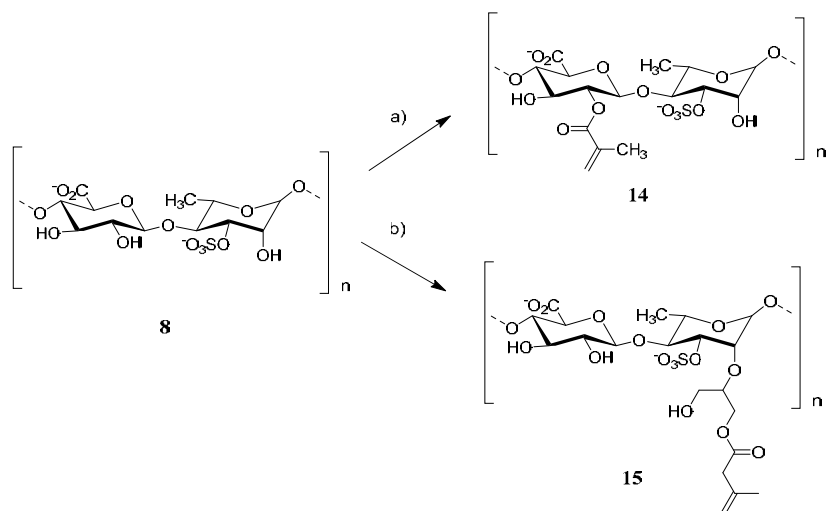


Figure 11. Funcionalização de ulvano com substituintes metacrílico. Reagentes: a) *anidrido metacrílico*, H₂O, pH 7-8, 4 °C, 24 h; b) *metacrílico de glicidila*, H₂O, pH 3'5, temperatura ambiente, 7 dias. Copyright © 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

A reacção do ulvano com reagentes orgânicos não é de todo fácil, pela insolubilidade destes em meio aquoso. Por isso, as reacções ocorrem em condições heterogêneas, e o grau de substituição obtido é geralmente baixo (0'5 a 1%). Além disso, um grande excesso de cada agente de metacrilização é sempre necessário devido à hidrólise competitiva do reagente pela própria água ao longo da reacção.

Na primeira reacção, ulvano foi dissolvido em água destilada à temperatura ambiente e um grande excesso de anidrido metacrílico foi adicionado lentamente (Dash e col., 2014). O pH da mistura de reacção foi controlado entre 7 e 8 por adição gota a gota de uma solução de hidróxido de sódio aquoso e deixou-se reagir a 4 °C durante 24 h. Em seguida, a reacção foi terminada por precipitação com etanol, e o produto dialisado contra água. A liofilização proporcionou o produto nº 14, metacrílico selectivamente no grupo 3'-hidroxilo do resíduo de ácido glucurónico. O rendimento de 14 variou de 60 a 75% e o grau de substituição (0'7-1'1%) foi calculado a partir do espectro de ¹H RMN por razão da área do pico do grupo metilo de metacrílico para a área do sinal do grupo metil da ramnose.

No segundo caso, ulvano foi dissolvido em água destilada à temperatura ambiente e o pH da solução foi ajustado para 3'5 pela adição de uma

solução aquosa de ácido clorídrico. Em seguida, um excesso de metacrilato de glicidila foi adicionado gota a gota e a solução resultante foi agitada vigorosamente durante sete dias à temperatura ambiente (Morelli e Chiellini, 2010). Durante o decorrer da reação, o pH foi monitorizado e mantido a 3,5. No final deste tempo, o ulvano modificado foi purificado por precipitação com etanol, duas vezes. Depois de diálise contra água e liofilização, o produto nº 15 foi obtido, desta vez selectivamente modificado no grupo 3-hydroxilo do resíduo de ramnose. O rendimento do produto foi inferior (entre 20 e 40%) e o grau de substituição calculado foi 0,5%. Em ambos os casos, as estruturas dos produtos modificados 14 e 15 foram confirmadas através de análise por ^1H RMN e FTIR.

Soluções de 14 e 15, ambas a uma concentração de 5% m/V foram preparadas em água. Uma pequena quantidade de um foto-iniciador de baixa citotoxicidade, IRGACURE 2959 (0,25% m/V), foi adicionado e as soluções foram expostas a luz UV com comprimento de onda de 365 nm durante um curto período de tempo (< 10 minutos). Subsequentemente, as soluções reticuladas foram liofilizadas para se obter as estruturas secas de ulvano. Porém as reações de polimerização não foram completas e após cerca de 10 minutos de exposição a luz UV, o grau de reticulação foi inferior a 70%, como determinado por integração dos picos correspondentes aos prótons olefínicos da ligação dupla carbono-carbono que não reagiu. Esta baixa eficiência de reticulação é bastante anormal, e tem sido sugerido que a actividade antioxidante do ulvano (Qi e col., 2005b), pode interferir ou neutralizar os radicais formados durante a irradiação de UV, reduzindo assim a taxa de foto-polimerização. Tem sido relatado que o ulvano possui actividade contra radicais de superóxido e hidroxilo (Qi e col., 2005b), propriedades que podem contribuir para inibir a reação de foto-polimerização.

A capacidade de inchamento dos hidrogéis formados por reticulação UV dos compostos 14 e 15 foi testada. Esta propriedade é responsável por muitas características dos hidrogéis, tais como a estabilidade mecânica, enzimática e estabilidade química, permeabilidade e biocompatibilidade. Após dois dias de imersão em solução salina de tampão de fosfato, hidrogéis formados a partir de ulvano metacrilado (nº 14) foram muito mais estáveis em termos de textura, resistência e propriedades mecânicas. Ao contrário, depois de apenas dois dias de imersão, as experiências com

hidrogéis formados a partir de ulvano metacrilado (nº 15) tiveram que ser interrompidas, uma vez que estes hidrogéis apresentavam propriedades mecânicas fracas e não podiam ser manipulados adequadamente. Pensa-se que este comportamento está relacionado com o grau relativamente baixo de substituição por metacrilato (aproximadamente 0'5%), que resulta num grau igualmente baixo de reticulação. Isto leva a produção de um hidrogel mais hidrofílico no caso de 15, que permite uma maior expansão em água e dá origem a menor estabilidade mecânica.

Não obstante estes problemas, os hidrogéis produzidos a partir de ulvano metacrilado (nº 14) poderão representar bons candidatos como estruturas tridimensionais citocompatíveis para a encapsulação de células. A propriedade antioxidante do ulvano, bem como sua capacidade para neutralizar radicais livres, poderá compensar o impacto negativo sobre as células de quaisquer espécies reactivas formadas durante a reacção de foto-polimerização. Além disso, a textura macia destes hidrogéis, que é uma consequência do baixo grau de substituição e polimerização do ulvano, pode ser apropriada para a correcta adaptação morfológica e proliferação de células, para a qual a rigidez da matriz é crucial.

Enquanto polissacarídeo poli-aniónio e com diversos grupos reactivos disponíveis, as possibilidades do ulvano na área biomédica não se esgotam no seu uso enquanto hidrogel. Por si, modificado ou em combinação com outros compostos, o ulvano é uma molécula natural e disponível para incorporação em diversos tipos de estruturas. Podemos mencionar um trabalho de desenvolvimento de filmes à base de ulvano para aplicações de libertação controlada em feridas dérmicas (Alves e col., 2012a), onde se toma proveito da capacidade de absorção de água do polímero. Algum esforço foi também direccionado à produção de partículas (Alves e col., 2012b) e nanofibras (Toskas e col, 2011), onde o ulvano é manipulado em combinação com outros elementos, contudo o uso de ulvano como biomaterial é ainda uma área parcamente explorada com promessa de crescimento nas próximas décadas.

3.4 Propriedades biológicas

Na valorização do polissacarídeo ulvano considera-se não só as suas propriedades físico-químicas, mas também as propriedades biológicas

que lhe estão atribuídas. A interacção de um composto com sistemas biológicos é de fundamental importância, podendo oferecer muitos benefícios em áreas como o desenvolvimento de novos fármacos e produtos nutracêuticos, ou de formulações dermocosméticas mais eficazes. Isto é especialmente relevante quando o composto é criado pela própria natureza, com as vantagens-chaves de ser de origem não-animal, e de uma fonte abundante e renovável. As propriedades biológicas reportadas até à data reforçam o interesse científico e o potencial comercial do ulvano.

No decorrer de vários trabalhos científicos, foram atribuídas ao ulvano várias propriedades com potencial para o desenvolvimento de novas soluções terapêuticas na área da saúde humana, incluindo actividade anticoagulante, anti-hiperlipídico e imunomodulatório.

A possibilidade de substituir a heparina por moléculas de origem não-animal tem levado a uma vasta procura de novas moléculas. Um estudo realizado *in vitro* mostrou que o ulvano interfere nas vias intrínsecas da coagulação do sangue (Mao e col., 2006), aumentando o tempo de coagulação sanguínea em semelhança com o fármaco heparina. Apesar da semelhança entre a estrutura do ulvano e da heparina (um glicosaminoglicano), os dados apontam para que o mecanismo de inibição da via de coagulação não seja exactamente equivalente. Contudo, supõe-se que os grupos sulfato do ulvano e a sua disposição no polímero tenham um papel crucial na sua actividade anticoagulante (Mao e col., 2006).

O valor já demonstrado pela *Ulva* enquanto suplemento alimentar incentivou um estudo mais aprofundado do impacto do ulvano na dieta. Experiências efectuadas em ratos permitiram concluir que a introdução de ulvano na alimentação provocou uma diminuição dos níveis de colesterol tipo LDL no sangue (Pengzhan e col., 2003). Os autores avançam a possibilidade de o ulvano interferir com a absorção de ácidos biliares, obrigando desta forma a que o colesterol tipo LDL seja removido da corrente sanguínea para o fígado e convertido em ácidos biliares, como forma de compensação. Este efeito foi associado directamente com o peso molecular e viscosidade do ulvano em teste, indicando uma vez mais a relação da actividade biológica com as características físico-químicas da molécula (Pengzhan e col., 2003).

São inúmeras as patologias que podem ser relacionadas com o sistema imunitário, quer pela sua estimulação, bem como pela sua dormência. Compostos imunomoduladores, que consigam estimular a resposta do sistema imunitário quando este por algum motivo está pouco ou não activo, são atraentes para diversas aplicações, como terapias oncológicas. O ulvano mostrou em ensaios *in vitro* e *in vivo* activar células macrófagas e a produção de várias citocinas (Kim e col., 2011). Existe semelhança estrutural entre o ulvano e glicosaminoglicanos associados a processos de estimulação inflamatória, como o sulfato de condroitina.

A importância da estrutura do ulvano na sua actividade biológica corresponde às expectativas, uma vez que a sulfatação é considerada um factor geral de actividade biológica entre polissacarídeos, e a sua composição com ácidos urónicos o torna similar a glicosaminoglicanos. Os glicosaminoglicanos são uma família de polissacarídeos lineares, na sua vasta maioria sulfatados e com ácidos urónicos, que interagem com proteínas e têm múltiplas e essenciais funções nas células. Mas existem ainda outras propriedades biológicas já identificadas no ulvano, por exemplo anti-adesão bacteriana (Gadenne e col., 2013) e activador das defesas em plantas superiores (Jaulneau e col., 2010).

Transversal a muitas áreas é a procura de novos compostos com capacidade anti-oxidante. Estudos *in vitro* indicam que ulvano extraído da *Ulva pertusa* tem a capacidade de sequestrar radicais livres e que esta propriedade estará associada ao grau de sulfatação e peso molecular do polissacarídeo (Qi e col., 2005a,b). Estes estudos abrem portas a um vasto leque de potenciais aplicações para o ulvano, do sector alimentar à farmacêutica, passando pela dermocosmética e veterinária.

A pesquisa de soluções de revestimento de superfícies que permitam bloquear a colonização por microorganismos é desejada por vários sectores, desde a alta tecnologia das próteses biomédicas, até aos sistemas de embalagem de alimentos. No caso de um estudo da incorporação de ulvano em superfícies de titânio, verificou-se uma redução de 90% da adesão de *Pseudomonas aeruginosa*, seguida de uma fraca capacidade de colonização (Gadenne e col., 2013). A potencial utilidade do ulvano para aplicação em biofilmes anti-adesivos é assim uma possibilidade a merecer investimento e exploração.

Para além da competência já mostrada do ulvano interagir em processos da biologia humana, foi também identificada a sua capacidade de promover processos em plantas superiores, criando assim novas possibilidades na área da agricultura sustentável. Foi demonstrado que a pulverização de soluções de ulvano estimula as defesas das plantas contra ataques de fungos. A pulverização de ulvano em feijoeiros estimulou a produção da enzima glucanase, promovendo a defesa destes contra o fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Freitas e Stadnik, 2012).

4. Considerações finais

A lista de propriedades biológicas do ulvano tem já uma dimensão apreciável, e vai para lá da sua semelhança estrutural com glicosaminoglicanos, tais como sulfato de condroitina e ácido hialurónico. Como o ulvano parece apresentar um conjunto de propriedades físico-químicas e biológicas superior a essas substâncias, é admissível propor ulvano como candidato para futuramente vir a substituir moléculas já com longa história no campo de medicina, mas com notáveis limitações de eficácia, duração do efeito ou segurança em determinadas áreas e aplicações.

Por isso, o interesse nas propriedades do ulvano é crescente e notório, e por certo levará a mais descobertas e à elucidação dos mecanismos de acção envolvidos. Exploração inteligente desse polissacarídeo sulfatado de origem natural pode representar uma abordagem alternativa à utilização de polímeros sintéticos ou de origem animal.

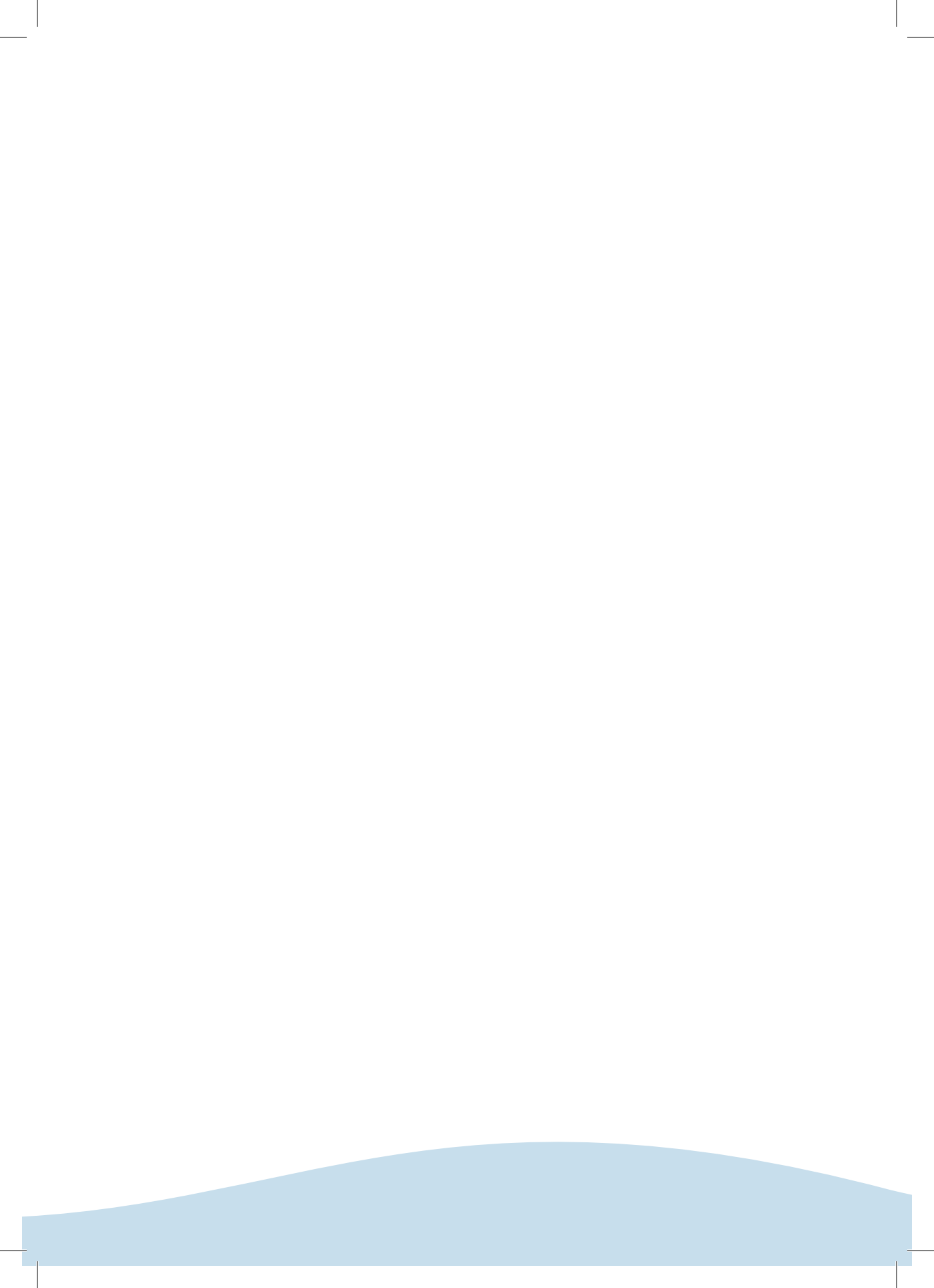
Mas sobretudo é esperado que nos próximos anos o conhecimento já gerado permita que este recurso oferecido pelos mares da península ibérica esteja a ser utilizado em aplicações concretas que inovem e melhorem a saúde e qualidade de vida de muitas pessoas.

Referências bibliográficas

- Alves A., Caridade S. G., Mano J. F., Sousa R. A., Reis R. L. (2010) Extraction and physico-chemical characterization of a versatile biodegradable polysaccharide obtained from green algae. *Carbohydrate Research*, 345: 2194-2200.
- Alves A., Pinho E. D., Neves N. M., Sousa R. A., Reis R. L. (2012a) Processing ulvan into 2D structures: cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 426: 76-81.

- Alves A., Duarte A. R. C., Mano J. F., Sousa R. A., Reis R. L. (2012b) PDLLA enriched with ulvan particles as novel 3D porous scaffold targeted for bone engineering. *The Journal of Supercritical Fluids*, 65: 32-38.
- Brading J. E., Georg-Plant M. M. T., Hardy D. (1954) The polysaccharide from the alga *Ulva lactuca*. Purification, hydrolysis, and methylation of the polysaccharide. *Journal of the Chemical Society*, 319-324.
- Costa C., Alves A. A., Pinto, P. R., Sousa R. A., Borges da Silva E. A. e col. (2012) Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers*, 88: 537-546.
- Dash M., Samal S. K., Bartoli C., Morelli, A., Smet P. F. e col. (2014) Biofunctionalization of ulvan scaffolds for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6: 3211-3218.
- Freitas B. M., Stadnik M. J. (2012) Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78: 8-13.
- Gadenne V., Lebrun L., Jouenne T., Thebault P. (2013) Antiadhesive activity of ulvan polysaccharides covalently immobilized onto titanium surface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 112: 229-236.
- Huang A. (1976) The influence of borate and calcium on the gel formation of a sulfated polysaccharide from *Ulva lactuca*. *Acta Chemica Scandinavica*, 30 (6): 562-566.
- Jaulneau V., Lafitte C., Jacquet C., Fournier S., Salamagne S. e col. (2010) Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 52591, 11 p.
- Kim J., Cho M. L., Karnjanapratum S., Shin I. S., You S. G. (2011) In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharides from *Enteromorpha prolifera*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49: 1051-1058.
- Lahaye M., Axelos M. A. V. (1993) Gelling properties of water-soluble polysaccharides from proliferating marine green seaweeds (*Ulva spp.*). *Carbohydrate Polymers*, 22: 261-265.
- Lahaye M., Inizan F., Vigouroux J. (1998) NMR analysis of the chemical structure of ulvan and of ulvan-boron complex. *Carbohydrate Polymers*, 36: 239-249.
- Lahaye M., Robic A. (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8 (6): 1765-1774.
- Mao W., Zang X., Li Y., Zhang H. (2006) Sulfated polysaccharides from marine green algae *Ulva conglobata* and their anticoagulant activity. *Journal of Applied Phycology*, 18: 9-14.
- McKinnel J. P., Percival E. (1962) Structural investigations on water-soluble polysaccharide of green seaweed *Enteromorpha Compressa*. *Journal of the Chemical Society*, 3141-3148.

- Morelli A., Chiellini F. (2010) Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: functionalization and hydrogel preparation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211: 821-832.
- Pengzhan Y., Ning L., Liu X., Zhou G., Zhang Q. e col. (2003) Antihyperlipidemic effects of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa* (Chlorophyta). *Pharmacological Research*, 48: 543-549.
- Qi H., Zhao T., Zhang Q., Li Z., Zhao Z. (2005a) Antioxidant activity of different molecular weight sulfated polysaccharides from *Ulva pertusa Kjellm* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 1: 527-534.
- Qi H., Zhang Q., Zhao T., Chen R., Zhang H. e col. (2005b) Antioxidant activity of different sulfate content derivatives of polysaccharide extracted from *Ulva pertusa* (Chlorophyta) in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 37: 195-199.
- Qi H., Liu X., Zhang J., Duan, Y., Wang X. e col. (2012) Synthesis and antihyperlipidemic activity of acetylated derivative of ulvan from *Ulva pertusa*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 50: 270-272.
- Robic A., Sassi, J. F., Lahaye M. (2008) Impact of stabilization treatments of the green seaweed *Ulva rotundata* (Chlorophyta) on the extraction yield, the physicochemical and rheological properties of ulvan. *Carbohydrate Polymers*, 74: 344-352.
- Robic A., Sassi J. F., Dion P., Lerat Y., Lahaye M. (2009) Sseasonal variability of physicochemical and rheological properties of ulvan in two ulva species (chlorophyta) from the Brittany coast. *Journal of Phycology*, 45: 962-973.
- Shao P., Qin M., Han L., Sun P. (2014) Rheology and characteristics of sulfated polysaccharides from chlorophytan seaweeds *Ulva fasciata*. *Carbohydrate Polymers*, 113: 365-372.
- Toskas G., Hund R. D., Laourine E., Cherif C., Smyrniotopoulos V. e col. (2011) Nanofibers based on polysaccharides from the green seaweed *Ulva rigida*. *Carbohydrate polymers*, 84: 1093-1102.
- Yaich H., Garna H., Besbes S., Paquot M., Blecker C. e col. (2013) Effect of extraction conditions on the yield and purity of ulvan extracted from *Ulva lactuca*. *Food Hydrocolloids*, 31: 375-382.
- Yaich H., Garna H., Besbes S., Barthélemy J. P., Paquot M. e col. (2014) Impact of extraction procedures on the chemical, rheological and textural properties of ulvan from *Ulva lactuca* of Tunisia coast. *Food Hydrocolloids*, 40: 53-63.
- Yamamoto M. (1980) Physicochemical studies on sulfated polysaccharides extracted from seaweeds at various temperatures. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44: 589-593.



Polissacarídeos de origem marinha para aplicação em estratégias de engenharia de tecidos

Lara L. Reys^{1,2}, Catarina Oliveira^{1,2}, J. Miguel Oliveira^{1,2}, Rita Lopez-Cebal^{1,2}, Simone S. Silva^{1,2}, Tiago H. Silva^{1,2*}, Rui L. Reis^{1,2}

¹ 3B's Research Group - Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence on Tissue Engineering and Regenerative Medicine, AvePark – Parque de Ciência e Tecnologia, 4805-017 Barco, Guimarães, Portugal.

² ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.
*tiago.silva@dep.uminho.pt

Resumo

Os polissacarídeos de origem marinha tem recebido atenção crescente, quer dos cientistas, quer dos engenheiros a nível industrial, pelas várias propriedades que lhes são conhecidas, bem como pela variedade química que evidenciam. São originários de um meio ainda pouco explorado, mas ao qual se tem procurado aplicar estratégias sustentáveis de utilização, pelo que o seu potencial de aplicação é, de facto, impressionante. Neste capítulo, será dada particular ênfase a dois polissacarídeos – quitosano e fucoídano – a título de exemplo, em ambos os casos atendendo à sua semelhança aos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular e por isso prometendo interesse muito significativo para a regeneração de tecidos.

1. Introdução

Em muitas patologias resultantes de acidentes ou doenças, o corpo humano sofre perda significativa de tecidos que não é capaz de regenerar. Em algumas dessas situações têm sido explorados diversos tipos de próteses, desde dispositivos metálicos até material biológico de diversos dadores

ou mesmo do próprio paciente. No entanto, nenhuma destas abordagens corresponde a uma solução definitiva, estando associadas a insuficiente recuperação de função, resposta imunológica severa e rejeição da prótese, para além da escassez de dadores compatíveis, entre outros. Procurando combater estas dificuldades, a Ciência tem visto desenvolver-se uma nova área de trabalho: a engenharia de tecidos humanos (Langer e Vacanti, 1993), que visa a regeneração destes através de abordagens incluídas num campo mais alargado denominado como medicina regenerativa. A estratégia geral de engenharia de tecidos inclui o desenvolvimento de estruturas poliméricas biodegradáveis nas quais se fará a cultura de células, visando o desenvolvimento de um tecido in-vitro que possa ser implantado no paciente e que promova a regeneração do tecido em falta através de uma excelente integração com os tecidos circundantes do local de implantação. Para o desenvolvimento desses sistemas de suporte à cultura celular – designados como *scaffolds* – têm sido selecionados diversos polímeros, de origem natural ou produzidos por síntese química ou por microorganismos geneticamente modificados, que podem ser processados por diversas tecnologias para originar as estruturas porosas ou hidrogéis pretendidos. Dentro dos polímeros naturais, tem sido dada ênfase aos que desempenham uma função de suporte no organismo de origem, procurando mimetizar a matriz extracelular dos animais, nomeadamente algumas proteínas e polissacarídeos, como colagénio e fibroína da seda ou celulose, amido, alginato e quitosano. Destacam-se assim alguns de origem marinha, salientando o potencial deste meio como fonte de matérias-primas muito diversas para o isolamento de polímeros com variadíssimas propriedades químicas e biológicas, para além das morfologias extremamente interessantes que se podem encontrar em muitos organismos marinhos (Silva e col., 2012a).

De facto, nos últimos anos tem sido possível ultrapassar algumas limitações tecnológicas que impediam a maior exploração do meio marinho e têm sido propostos vários polímeros com interesse biológico e biomédico, que se juntam ao agar, conhecido há muitos anos (Renn, 1984). Surgem assim a quitina e o quitosano (que correspondem na verdade à mesma família de polímeros, sendo o segundo a versão mais desacetilada do primeiro, existente em diversas classes de seres vivos e constituindo o segundo polímero natural mais abundante, a seguir à celulose), o alginato, as carrageninas, a condroitina sulfato e outros polissacarídeos

sulfatados. Todos eles, sendo polissacarídeos, são caracterizados por uma cadeia polimérica constituída por diferentes açúcares e seus derivados, com predominância para a glucose e seus derivados glucosamina e ácido glucurónico, galactose e galactosamina, fucose, entre outros; podendo vários deles possuir um ou mais grupos sulfato, ligados entre si por ligações glicosídicas. Embora possam ser aparentemente semelhantes, pequenas diferenças na sua estrutura são responsáveis por alterações significativas nas suas propriedades. Por exemplo, a quitina e o quitosano distinguem-se pela presença de grupos amina livres e passíveis de serem protonados em soluções ácidas, particularmente o quitosano em que os grupos amina livres são muito mais abundantes, correspondendo assim a um polímero, sendo o único conhecido de origem natural. Por outro lado, polímeros naturais com carga negativa – polianiões – são caracterizados pela presença de grupos sulfato ($-\text{OSO}_3^-$), como as carrageninas ou a fucoídiana, ou carboxilato ($-\text{COO}^-$), como o alginato.

Para não tornar o capítulo demasiado longo e sublinhando o caráter ilustrativo e de divulgação que se pretende dar a este texto, foram selecionados dois polissacarídeos que serão discutidos em maior detalhe nas secções seguintes: quitosano e fucoídiana. Em ambos os casos têm sido estudados como modelos dos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular e de seguida serão abordados os processos de produção a partir de organismos marinhos e a sua utilização em contexto biomédico.

2. Quitina / Quitosano

A quitina é o segundo polímero natural mais abundante, depois da celulose. Trata-se concretamente de um polissacarídeo, composto por monómeros de N-acetil-D-glucosamina e de D-glucosamina, unidos por ligações β -D-(1 \rightarrow 4) (Cheng e col., 2014b). Existem dois tipos de quitina na natureza, α e β , entre as quais existem diferenças estruturais (força das ligações por pontes de hidrogênio, forças intermoleculares e cristalinidade). Estas diferenças terão influência nas propriedades físico-químicas exibidas pelos polímeros, nomeadamente solubilidade e reatividade em soluções alcalinas (Jung e Zhao, 2014) moisture absorption ability and deacetylating reaction of β -chitin extracted from jumbo squid (*Dosidicus gigas*. Em função do tipo de fonte marinha a partir da qual é extraída, obteremos um tipo ou o outro de quitina. A α -quitina é o tipo mais abundante na natureza

e dentro do âmbito marinho encontra-se formando parte do exoesqueleto de vários crustáceos. A fonte comercial mais importante de α -quitina são o caranguejo e o camarão. A β -quitina, por outro lado, encontra-se nos endoesqueletos de alguns moluscos (Langer e Vacanti, 1993, Kim e Mooney, 1998, Rinaudo, 2006, (Cheng e col., 2014b).

2.1 Extração da quitina e obtenção do quitosano

A quitina está presente no exoesqueleto de caranguejos e camarões (α -quitina), sendo alguns exemplos dos géneros mais estudados os seguintes: *Erimacus* (caranguejo), *Cragon* (camarão) e *Homarus* (lagosta) (Campana-Filho e col., 2007). Esta quitina encontra-se intimamente associada a proteínas, minerais, lípidos e pigmentos. Assim, para isolar a quitina, a matéria-prima deve ser submetida a um processamento químico para a sua desmineralização e desproteínização. No primeiro caso usam-se normalmente ácidos fortes para a eliminação do carbonato de cálcio, enquanto que no segundo utilizam-se normalmente bases fortes que promovem a hidrólise das proteínas. Uma alternativa a este último tratamento químico é a utilização de microrganismos ou enzimas proteolíticas (Gasparini e col., 2014, Younes e col., 2014). Os processos anteriormente referidos não são suficientes para a eliminação dos pigmentos vermelhos, carotenóides, que formam parte dos exoesqueletos dos crustáceos, pelo que se deverão lavar com acetona ou etanol para a remoção dos mesmos (Hsieh e col., 2003, Maoka 2011). O uso de acetona ou etanol também contribuirá para eliminação dos possíveis lípidos presentes.

A β -quitina é isolada essencialmente de endoesqueletos de lulas e chocos (Jayakumar e col., 2010). Alguns exemplos de espécies mais estudadas são: *Illex argentinus* (pota argentina), *Dosidicus gigas* (lula gigante), *Loligo vulgaris* (lula comum) e *Seppidae* sp. (choco) (Silva e col., 2008a). Inicialmente, os materiais para extração da quitina são lavados com água para remover todas as impurezas. Pequenos pedaços dessa matéria-prima são depois obtidos por moagem e subsequentemente submetidos a um processo de desproteínização, que envolve um tratamento com uma solução aquosa de hidróxido de sódio na proporção de 1:15 (m/v) durante 24 horas, sob agitação. O material obtido é lavado e seco para posterior obtenção do quitosano. A extração de β -quitina tem a vantagem de que os

processos de desmineralização e descoloração não são necessários, dado que os minerais e pigmentos carotenóides neste material estão presentes em quantidades negligenciáveis ou mesmo inexistentes (Reys e col., 2013, Jung e Zhao, 2014).

A eliminação de grupos acetilo da quitina, desacetilação, dará lugar ao derivado mais importante da quitina em termos de aplicações (aplicações cosméticas, alimentares biomédicas e farmacêuticas), o quitosano (Rinaudo, 2006). Esta desacetilação consegue-se deixando a quitina reagir com hidróxido de sódio (NaOH) concentrada (50% NaOH), a elevada temperatura (90°-100° C) e durante várias horas (Evans e col., 2002, Hsieh e col., 2003, Reys e col., 2013). Concretamente, poderá se considerar que se obteve quitosano a partir da desacetilação da quitina com um máximo de 40% de unidades N-acetyl-d-glicosamino (Dimzon e col., 2013). A obtenção de quitosano pode ser confirmado também dissolvendo-o em soluções ácidas diluídas. Para aplicações em engenharia de tecidos, o quitosano deve ter um elevado grau de pureza e, por isso o polímero deve ser submetido a um processo de purificação. O processo de purificação normalmente utilizado é o método de reprecipitação. Neste processo, o quitosano é dissolvido numa solução diluída de ácido acético (1% w/v) e mantido sob agitação por 24h. Depois disso, a solução é filtrada e a precipitação do polímero é realizada usando uma solução de hidróxido de sódio. Durante a precipitação, o pH deve ser medido para evitar que o sistema atinja valores alcalinos altos que podem promover um processo de desacetilação. No final do processo, o material precipitado é lavado com água destilada até o pH neutro e depois com etanol. O material purificado deverá ser seco a temperatura ambiente ou liofilizado (Signini e Campana-Filho, 1998, Reys e col., 2013).

As diferenças entre as quitinas α e β determinarão distintas propriedades nos quitosanos obtidos a partir das mesmas.

2.2 Propriedades do quitosano

O quitosano apresenta características muito interessantes, tais como a biodegradabilidade, a biocompatibilidade, a atividade anti-microbiana, a capacidade antioxidante, a ausência de toxicidade, a ação hemostática e a natureza catiónica (Silva e col., 2010). Devido à sua estrutura cristalina

estável, o quitosano é normalmente insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas diluídas. Nestas soluções a solubilização do quitosano é promovida pela protonação dos grupos amina ($-NH_2$) livres presentes nas suas unidades desacetiladas, com pK_a próximo de 6.3. (Rinaudo e col., 1999).

Com soluções ácidas diluídas do quitosano é possível produzir membranas, enquanto géis podem ser formados usando soluções poliméricas concentradas. Por sua vez, partículas e fibras podem ser produzidas através do gotejamento ou contacto direto da solução de quitosano com um banho de coagulação alcalino (Silva e col., 2010). Alternativamente, estruturas porosas e tubos podem ser produzidos por liofilização. A natureza catiónica do quitosano permite a formação de complexos iónicos com uma variedade de polímeros aniónicos tais como alginato, gelatina, entre outros (Mano e col., 2007, Silva e col., 2010). Além disso, interações electrostáticas com glicosaminoglicanos (GAG), proteoglicanos e outras moléculas de carga negativa também são investigadas (Reys e col., 2013).

Recentemente, tem havido um interesse crescente na modificação química do quitosano para melhorar a sua solubilidade e expandir as suas aplicações. Vários tipos de reações químicas, como por exemplo reações de reticulação, copolimerização, carboximetilação, entre outras, são propostas na literatura (Alves e Mano, 2008). Estas reações ocorrem preferencialmente através dos grupos funcionais reativos (grupos amina e hidroxilo) presentes na estrutura química do quitosano (Rinaudo, 2006, Alves e Mano 2008). Por exemplo, a introdução de pequenos grupos funcionais na estrutura do quitosano, tais como grupos carboximetilo, pode aumentar drasticamente a sua solubilidade em soluções com pH neutro sem afetar o seu carácter catiónico (Upadhyaya e col., 2014).

2.3 Misturas poliméricas à base de quitosano

O uso de quitosano combinado com outros polímeros (quer naturais ou sintéticos) tais como fibroína da seda (Silva e col., 2008b, 2012b), proteína da soja (Silva e col., 2005, 2007, Santos e col., 2013), ácido hialurónico (Correia e col., 2011), gelatina (Dhandayuthapani e col., 2010), e colagénio (Sarkar e col., 2013), tem aumentado gradualmente ao longo dos anos. O interesse nestas misturas para aplicações biomédicas deve-se às inúmeras

propriedades químicas e biológicas do quitosano, incluindo a sua grande abundância como recurso natural economicamente atrativo, propriedades de absorção, capacidade de formar membranas, bioadesividade, atividade contra fungos e bactérias, biocompatibilidade, biodegradabilidade e poder hemostático (Silva e col., 2010). Diferentes matrizes poliméricas tais como membranas, hidrogéis, estruturas porosas e micro/nanoparticulas têm sido produzidas a partir de diferentes misturas poliméricas usando variadíssimas metodologias (Silva e col., 2010). Por exemplo, membranas podem ser obtidas usando evaporação por solvente (Silva e col., 2008a) enquanto hidrogéis podem ser processados por reações de reticulação, complexação ou reações de copolimerização (Alves e Mano, 2008). As matrizes desenvolvidas podem ser utilizadas como substitutos dérmicos, curativos para cicatrização de feridas, estruturas tridimensionais (3D) porosas para regeneração da cartilagem, osso e pele (ver Tabela 1).

Complexos de polieletrólitos (PEC) podem ser formados, por exemplo, pela interação entre quitosano e gelatina, através da formação de pontes de hidrogénio e atração electrostática entre grupos amino do quitosano com grupos carboxílicos presentes na gelatina (Dhandayuthapani e col., 2010). Em outros estudos a complexação de quitosano com condroitina sulfato tem sido usada para a produção de nanopartículas (Santo e col., 2012). Investigações recentes descrevem o uso de interações entre quitosano e proteínas e extratos de plantas medicinais para o desenvolvimento de matrizes com propriedades mecânicas, biodegradabilidade e biocompatibilidade adequadas para regeneração da pele e cartilagem (Silva e col., 2005, 2008b, 2013a, 2013d). Silva e colegas exploraram as misturas de quitosano com gel de aloé vera para a produção de membranas para cicatrização de feridas (Silva e col., 2013d). As membranas de quitosano/ aloé vera apresentaram valores de rugosidade, inchamento, atividade antibacteriana e propriedades mecânicas superiores aos de membranas de quitosano. Além disso, ensaios *in vitro* demonstraram que a adesão e proliferação de fibroblastos humanos nas membranas de quitosano/aloé vera foi superior ao verificado em membranas de quitosano (Silva e col., 2013d).

Tabela 1. Matrizes à base de quitosano para aplicações biomédicas.

Composição	Metodologia	Tipo de matriz	Potenciais aplicações	Referências
Quitosano/ácido hialurónico	Liofilização	Estruturas porosas 3D	Regeneração da cartilagem	(Correia e col., 2011)
Quitosano/alginate	Evaporação por solvente	Membranas	Aplicações biomédicas	(Silva e col., 2015)
Quitosano/aloé vera	Evaporação por solvente	Membranas	Cicatrização de feridas	(Silva e col., 2013d)
	Evaporação por solvente com reticulação	Membranas	Cicatrização de feridas	(Silva e col., 2013a)
Quitosano/colagénio	Eletrofição	Estruturas porosas 3D	Regeneração da pele	(Sarkar e col., 2013)
Quitosano/carboximetil-celulose	Liofilização	Complexos	Libertação controlada de fármacos	(Bigucci e col., 2015)
Quitosano/fibroína da seda	Reticulação e Liofilização	Estruturas porosas 3D	Regeneração da cartilagem	(Silva e col., 2008b)
	Gelificação usando líquidos iónicos	Hidrogéis	Regeneração da pele	(Silva e col., 2012b)
Quitosano/gelatina	Eletrofição	Nanofibras	Regeneração da pele	(Dhandayuthapani e col., 2010)
Quitosano/GGMA	Fotopolimerização	Hidrogéis	Engenharia de tecidos	(Coutinho e col., 2012)
Quitosano/proteína da soja	Evaporação por solvente	Membranas	Cicatrização de feridas	(Silva e col., 2005, 2007, Santos e col., 2013)

Quitossano/proteína da soja/TEOS	Processo sol-gel e Evaporação por solvente	Membranas	Cicatrização de feridas Estratégias de regeneração óssea	(Silva e col., 2013c)
Quitossano/proteína da soja/TEOS	Processo sol-gel e Liofilização	Estruturas porosas 3D	Engenharia de tecidos	(Silva e col., 2006)
Quitossano/condroitina sulfato	Complexação	Nanopartículas	Regeneração óssea	(Santo e col., 2012)
Quitossano/PLLA	Evaporação por solvente	Filmes	Aplicações biomédicas	(Ferreira e col., 2014)
Quitossano/PLLA	Fluídos supercríticos	Estruturas porosas 3D	Engenharia de tecidos	(Duarte e col., 2010)
Quitossano/PBS	Extrusão	Estruturas fibrosas 3D	Engenharia de tecidos	(Costa-Pinto e col., 2014)
Quitossano/policaprolactona	Extrusão	Estruturas fibrosas 3D	Regeneração de cartilagem	(Neves e col., 2011)
Quitossano/biovidro	Evaporação por solvente	Nanopartículas/Membranas	Regeneração periodontal	(Mota e col., 2012)
Quitossano/HA	Liofilização	Estruturas porosas 3D	Defeitos osteocondrais	(Oliveira e col., 2006)

Abreviaturas: PLLA – poli-ácido láctico; HA – hidroxiapatite; PBS – poli-butireno succinato; GGMA – goma gelana metacrilada; TEOS – tetraetilortossilicato.

2.4. Preparação de sistemas poliméricos à base de quitosano

Os sistemas poliméricos, em particular membranas e estruturas porosas, podem ser produzidos com os dois tipos de quitosano, obtidos de lulas ou de crustáceos (Reys e col., 2013, Reys e col., 2015b).

Produção de membranas de quitosano

Membranas de quitosano podem ser obtidas pela técnica de evaporação de solvente (Reys e col., 2013, Silva e col., 2013d). Este método é composto por vários passos, iniciando na dissolução do quitosano em soluções aquosas de ácido acético. Posteriormente a solução polimérica é colocada em moldes apropriados e deixa-se secar por 3 a 4 dias à temperatura ambiente para evaporação do solvente. De forma a remover o ácido acético, as membranas necessitam de ser neutralizadas com uma solução básica (ex. hidróxido de sódio, NaOH) e lavadas com água destilada até a neutralidade, seguindo-se o processo de secagem à temperatura ambiente ou liofilização (Silva e col., 2008a, Reys e col., 2013).

Produção de estruturas porosas

As estruturas porosas de quitosano são usualmente preparadas usando diferentes técnicas tais como liofilização, emulsão, prototipagem rápida, metodologias baseadas em fusão, aglomeração de partículas, entre outras (Malafaya e col., 2005, Oliveira e col., 2006, Correlo e col., 2007, Silva e col., 2008b, Correlo e col., 2009). Destas, a técnica de liofilização é provavelmente o método mais amplamente utilizado para produzir estruturas com diferentes formas, porosidades e tamanhos de poros diferentes através da variação de parâmetros como concentração do polímero, temperatura de congelamento e tipo de moldes (Oliveira e col., 2006, Reys e col., 2013). Nesta secção serão descritas as técnicas de liofilização e de aglomeração de partículas.

Liofilização. O método da liofilização permite a obtenção de estruturas altamente porosas por meio do congelamento da solução polimérica, com temperaturas variando entre $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Haugh e col., 2010, Reys e col., 2015b), seguido da remoção do solvente através da liofilização. A temperatura de congelamento deve ser suficiente para manter todas as

moléculas do solvente em estado sólido. Durante a liofilização o espaço ocupado pelos cristais de gelo tornou-se vazio após a sublimação, criando poros.

Por exemplo, estruturas de quitosano produzidas por liofilização foram preparadas a partir da dissolução do quitosano numa solução aquosa diluída de ácido acético, a qual foi transferida para moldes de silicone. Posteriormente, os moldes foram congelados a baixa temperatura, como por exemplo $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, a que se seguiu a liofilização durante 3 a 4 dias para remoção do solvente. A temperatura de congelamento influencia o tamanho de poro pois está relacionado com a velocidade de formação do cristal de gelo. Estudos demonstraram que estruturas porosas obtidas a partir de soluções congeladas a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram uma estrutura mais fechada e compacta, com valores de diâmetro médio de poro entre 110 e $210\text{ }\mu\text{m}$, enquanto as congeladas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentam valores entre 200 - $250\text{ }\mu\text{m}$ (Reys e col., 2013). Para garantir a porosidade do material após a neutralização, as estruturas são congeladas e submetidas novamente a liofilização (Oliveira e col., 2006, Reys e col., 2013).

Após a liofilização, as estruturas devem ser neutralizadas com uma solução de hidróxido e sódio ou com misturas de hidróxido de sódio e etanol. Este tratamento é feito para evitar a destruição parcial da morfologia do material (Reys e col., 2013). Para garantir a porosidade do material após a neutralização, as estruturas são congeladas e submetidas novamente a liofilização (Oliveira e col., 2006, Reys e col., 2013).

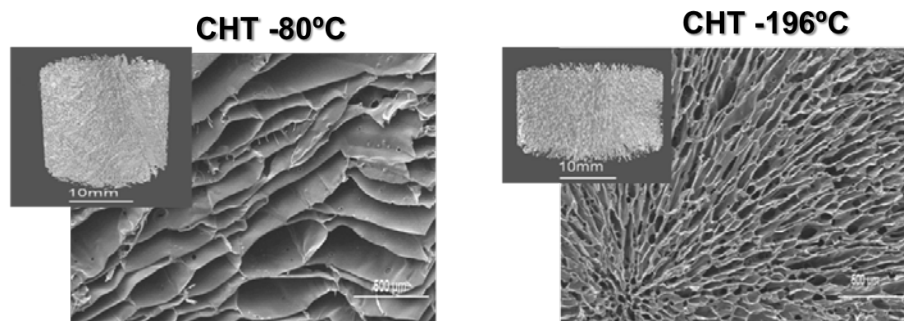


Figura 1. Estruturas porosas de quitosano (CHT) congeladas com diferentes temperaturas e subsequentemente submetidas a liofilização.

Aglomeración de partículas. O método de aglomeração de partículas permite a obtenção de estruturas porosas através da aglomeração de microesferas

pré-fabricadas. Esta técnica é geralmente baseada no empacotamento de microsferas aleatoriamente e posteriormente agregação por meios físicos e térmicos, formando uma estrutura tridimensional.

Para tal dissolve-se o quitosano purificado na proporção de 2:100 (m/v) numa solução de ácido acético a 1%, mantendo sob agitação por uma noite. De seguida, a solução de quitosano é dispensada, gota a gota, para um banho contendo uma solução alcalina, usada como agente precipitante para promover a formação de partículas. Partículas de diferentes tamanhos são produzidas usando diferentes condições experimentais. As partículas obtidas são deixadas no banho (neutralização) por uma noite, seguida de lavagens com água destilada. O processo de obtenção das estruturas porosas consiste em colocar as partículas em moldes, as quais serão submetidas a uma determinada pressão e posterior secagem numa estufa a 60 °C durante 3 dias (Malafaya e col., 2005).

Uma metodologia semelhante pode ser utilizada para a produção de estruturas compósitas de quitosano de lula e nano-hidroxiapatite de origem marinha, sendo que a nano-hidroxiapatite é adicionada na proporção de 3:100 (m/V) da solução de quitosano de lula.

2.5 Aplicações

As propriedades intrínsecas do quitosano mencionadas anteriormente sugerem que este biomaterial pode ser usado em diversas áreas como agricultura, proteção ambiental, indústria alimentar, biotecnologia, ciência de materiais, indústria farmacêutica e área biomédica (Aranaz e col., 2009, Dutta e col., 2004, Silva e col., 2010). Particularmente em engenharia de tecidos e medicina regenerativa, estruturas à base de quitosano (Figura 2) têm sido utilizadas no desenvolvimento de sistemas de libertação controlada de moléculas terapêuticas (fatores de crescimento, fármacos), sistemas injetáveis e suportes 3D porosos para regeneração da pele, osso, nervos e cartilagem, entre outros (Oliveira e col., 2006, Silva e col., 2008b, Yilgor e col., 2009, Neves e col., 2011, Tseng e col., 2013, Wang e col., 2013, Francis e col., 2014, Martins e col., 2014).

Considerando que o quitosano promove proteção para feridas, aceleração da cicatrização e uma ação antibacteriana, membranas de quitosano ou combinações deste polímero com proteínas ou outras macromoléculas

(Santos e col., 2013, Silva e col., 2013a) têm sido propostas como coberturas para feridas ou como pele artificial e hidrogéis. Alguns exemplos podem ser encontrados na Tabela 1.

Estruturas de quitosano têm sido sugeridas para regeneração da cartilagem, considerando que a sua estrutura e características se assemelham às de glicosaminoglicanos, que são conhecidos constituintes da matriz extracelular da cartilagem, tendo também um papel fundamental no apoio à condrogênese *in vitro* e *in vivo* (Suh e Matthew, 2000). Silva e colegas desenvolveram estruturas porosas combinando quitosano com a fibroína da seda. O contato direto dessas estruturas com uma linha celular de pré-condrócitos (ATDC5) permitiu a sua adesão e proliferação, bem como a produção de matriz extracelular durante os 28 dias de cultura. Os resultados dos ensaios biológicos associados às propriedades das estruturas sugerem que estes sistemas podem ser bons candidatos para a sua utilização em engenharia de tecidos para regeneração da cartilagem (Silva e col., 2008b, Silva e col., 2013b).

Particularmente para defeitos osteocondrais, o uso de estruturas porosas simples de quitosano para regenerar cartilagem pode não ser eficaz, tendo em alternativa sido proposto o uso de estruturas com duas camadas (Mano e Reis, 2007). Essas abordagens consistem em desenvolver novas estruturas bifásicas que fornecerão regiões diferenciadas para promover tanto a regeneração óssea quanto a da cartilagem. Oliveira e colegas desenvolveram estruturas poliméricas bifásicas combinando quitosano com hidroxiapatite através de um processo de sinterização e liofilização (Oliveira e col., 2006) (Figura 3). Resultados biológicos demonstraram que ambas as camadas são suportes 3D adequados para a adesão e proliferação de células estaminais de medula óssea e sua diferenciação em osteoblastos e condrócitos.

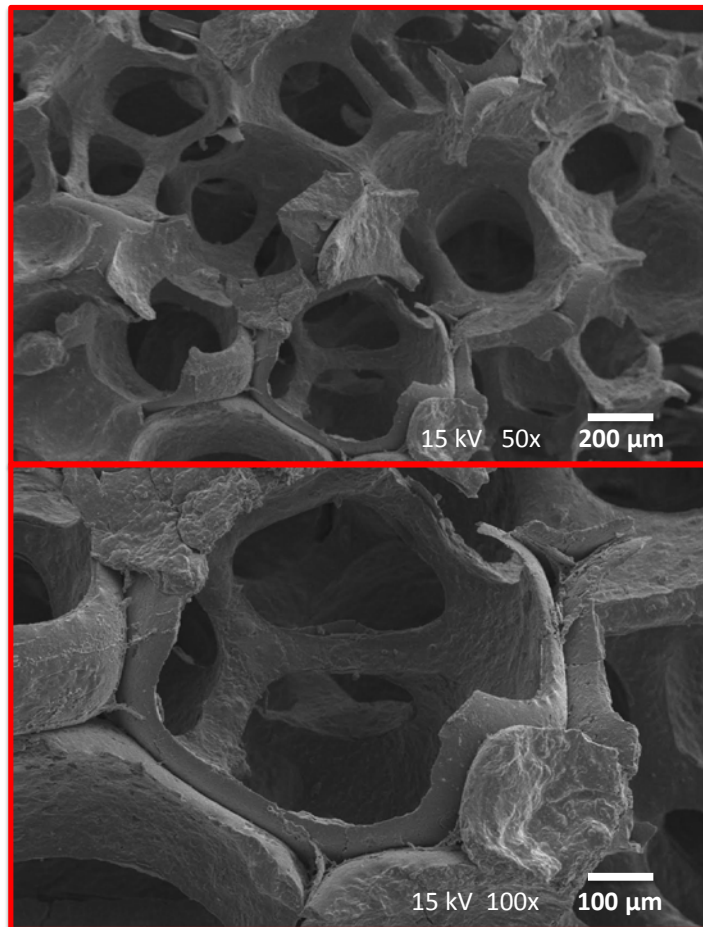


Figura 2. Imagens de SEM das estruturas porosas de quitosano/hidroxiapatite

Matrizes de quitosano têm sido investigadas também para o desenvolvimento de terapias contra o cancro. Nestas abordagens, estruturas 3D são desenvolvidas para mimetizar o ambiente biológico do cancro de modo a facilitar o estudo do comportamento *in vitro* das células tumorais ou a realização de testes de novas moléculas terapêuticas (Florczyk e col., 2013, Huang e Hsu, 2014, Kievit e col., 2014).

Sistemas de libertação de fármacos têm sido desenvolvidos usando quitosano em diferentes formas, tais como membranas, nanopartículas, comprimidos e hidrogéis. Nestas abordagens, o fármaco pode ser incorporado na solução polimérica, por complexação com o polímero ou

na preparação de comprimidos. Por exemplo, complexos formados por quitosano e carboximetilcelulose com clorohexidina (antisséptico de amplo espectro) foram investigados para libertação vaginal do fármaco (Bigucci e col., 2015), enquanto filmes de quitosano foram desenvolvidos para a administração de ibuprofeno na mucosa bucal (Tang e col., 2014). Por seu turno, Calinescu e colegas elaboraram comprimidos gastrorresistentes destinados à libertação controlada de proteínas terapêuticas no intestino (Calinescu e col., 2012) e Cheng e colegas obtiveram hidrogeis de quitosano para a libertação sustentada de latanoprost (anti-hipertensivo ocular), destinados a serem usados na terapêutica do glaucoma (Cheng e col., 2014a). Além disso, Hermans e colegas prepararam filmes de quitosano que foram usados para prolongar a libertação de ciclosporina A (imunodepressor) após a sua administração ocular, com a finalidade da sua utilização no tratamento do olho seco (Hermans e col., 2014) e Bhalerao e colegas trabalharam na elaboração de filmes compostos de quitosano e heparina para a libertação controlada de fármacos destinados ao tratamento da malária (Bhalerao e col., 2015).

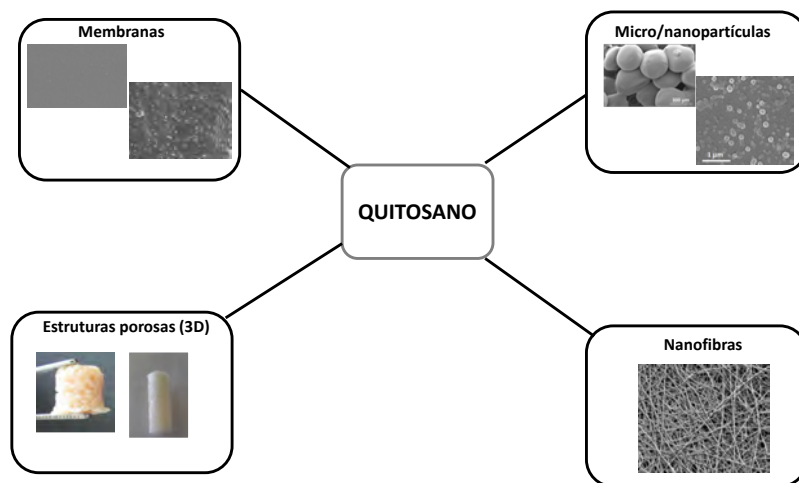


Figura 3. Estruturas poliméricas produzidas à base de quitosano.

3. Fucoídana

A fucoídana é um polissacarídeo sulfatado aniônico que está presente na parede tecidular das algas nas secções intracelulares da matriz. Este

polissacarídeo tem sido isolado a partir de diferentes espécies de algas castanhas tais como *Fucus vesiculosus*, *Ecklonia cava* e *Undaria pinnatifida* (Sezer e Cevher, 2011, Wijesinghe e Jeon, 2012). Estruturalmente, o fucoídano é formado fundamentalmente por diferentes quantidades de L-fucose, ácido glucorónico e xilose, embora outros açúcares possam também estar presentes (Silvas e col., 2012a). O interesse neste polissacarídeo sulfatado vem das suas propriedades intrínsecas, nomeadamente anti-tumoral (Li e col., 2008, Shilpi e Nissreen, 2011), anti-coagulante (Mourão, 2004, Li e col., 2008, Shilpi e Nissreen, 2011) anti-viral (Mourão, 2004, Mandal e col., 2007, Li e col., 2008, Shilpi e Nissreen, 2011), anti-inflamatório (Maruyama e col., 2005, Li e col., 2008) e redutor do açúcar no sangue (Li e col., 2008). O fucoídano tem vindo a ser usado com sucesso em diferentes áreas, tais como a alimentar, a cosmética, a farmacêutica e a medicina (Kitamura e col., 1991). A exploração do fucoídano apresenta um interesse económico e ambiental, representando uma estratégia de valorização de produtos marinhos (Ponce e col., 2003). Neste capítulo o potencial das aplicações do fucoídano será considerado em diferentes áreas, nomeadamente a alimentar, a cosmética e a farmacêutica, mas tendo maior interesse na investigação na área biomédica. Informações complementares quanto aos métodos de extração e de processamento serão também referidos oportunamente.

3.1 Extração da fucoídano

Muitos são os métodos de extração da fucoídano que tem vindo a ser estudados e utilizados na indústria para produzir fucoídano de elevada qualidade. A fucoídano pode ser extraída usando os seguintes métodos: ultrassons, micro-ondas assistido, soluções de etanol/água e acídicas, e um processo enzimático (Pomin e col., 2005). Nestes métodos, um ajuste dos parâmetros tais como: temperatura, tempo de extração, concentração de ácido, pH e tipo de alga devem ser controlados de modo a evitar a degradação da cadeia de fucose e remoção de alguns componentes insolúveis. A composição química, número de sulfatos, estrutura química, peso molecular e rendimentos podem ser afectados pelos aspectos mencionados anteriormente (Ale e col., 2011). Na extração clássica da fucoídano, as algas castanhas são tratadas com soluções acídicas a quente e posteriormente o uso de soluções de cálcio para promover a precipitação do alginato (Kitamura e col., 1991, Hahn e col., 2012). O etanol usado

durante a extração tem por função remover pequenas partículas e sais que estiverem presentes nos polissacarídeos. Na Figura 4 podemos observar o processo de extração aquosa e que engloba três passos: i) granular as algas castanhas, ii) extração e purificação dos extractos e iii) secagem e armazenamento do material em local seco (Ponce e col., 2003). Em concreto, a fucoídana tem sido extraída de algas castanhas usando soluções ácidas a quente (ácido clorídrico) ou soluções de etanol/água (d'Ayala, Malinconico e col., 2008, Mak, 2012). A extração com solventes ácidos como o HCl dão elevado rendimento à amostra pura de fucoídana, mas poderá resultar na extração de produtos não desejados como alginato e metais, podendo causar degradação da cadeia de fucose (Ale e col., 2011). A vantagem de extração com soluções ácidas a quente é a precipitação dos alginatos. Contudo, a aplicação de ácido diluído resulta na quebra do éster sulfato (Mak, 2012). O passo seguinte será a precipitação de alginatos com cálcio, separados do extrato de fucoídana por centrifugação (Foley e col., 2001). Finalmente, o extracto de fucoídana deverá ser purificado de forma a obter o material mais puro possível. A purificação da fucoídana pode ser feita utilizando diferentes métodos, tais como tratamento com álcool/formaldeído e cloreto de cetilpiridina, seguido de diálise e liofilização para obter material na forma de pó (Kitamura e col., 1991, Passaquet e col., 1991, Duarte e col., 2001, d'Ayala, Malinconico e col., 2008, Sezer e Cevher, 2011). A fucoídana tem normalmente uma cor que pode variar entre o amarelo e o castanho, estando diretamente relacionada com a quantidade de fucoídana presente no extrato (Sezer e Cevher, 2011, Mak, 2012) cor que pode variar entre o amarelo e o castanho, estando diretamente relacionada com a quantidade de fucoídana presente no extrato (Sezer e Cevher, 2011, Mak, 2012).



Figura 4. Esquema de extração da fucoídana.

A composição química e estrutural da fucoídana tem vindo a ser muito estudada ao longo dos últimos anos, mas ainda não se encontra definitivamente estabelecida (Mak, 2012). Os principais componentes da fucoídana são L-fucose, grupos sulfato e outros monossacáridos como manose (Duarte e col., 2001), galactose (Rocha e col., 2005), glucose (Nagaoka e col., 1999), xilose (Rocha e col., 2005) e ácidos urónicos (Nagaoka e col., 1999, Ponce e col., 2003). A estrutura química da fucoídana é geralmente composta por resíduos de α -L-fucopiranosose ligados entre si por ligações (1 \rightarrow 3) ou alternadas (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 4). O tipo de ligação está relacionada com a espécie de alga castanha origem da fucoídana (Chizhov e col., 1999). De facto, na literatura é referenciado que a estrutura química da fucoídana varia com a espécie de alga, a localização geográfica, estação do ano em que é colhida e a maturidade da planta (Foley e col., 2001, Mak, 2012). Na Figura 5 podemos observar dois tipos de fucoídana, com diferentes graus de sulfatação.

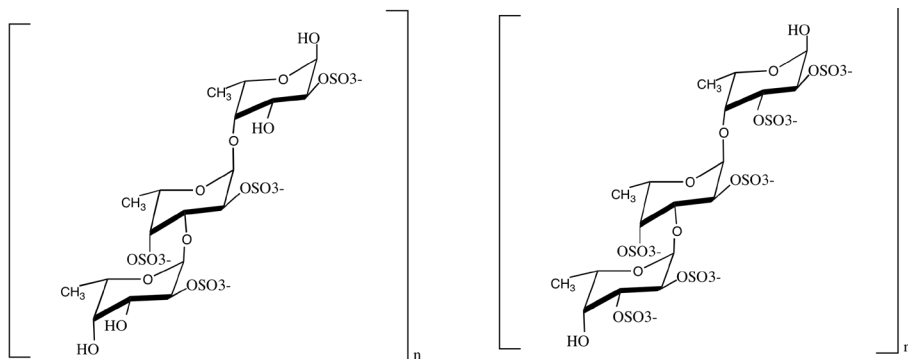


Figura 5. Estrutura química modelo da fucoídana, com diferentes graus de sulfatação (mais elevado na estrutura da direita, com dois grupos sulfato por cada monómero, contra 1'5 na estrutura da esquerda).

3.2 Propriedades da fucoídana

A fucoídana apresenta várias propriedades de interesse para a área biomédica e de engenharia de tecidos, tais como anti-inflamatória, antioxidante, anticoagulante, antiviral e anticancerígena (Silva e col., 2012a). Na Tabela 2 estão ilustradas algumas dessas propriedades bioativas e sua relevância para diversas aplicações na área biomédica. As propriedades da fucoídana podem ser influenciadas pela espécie de alga,

variação de açúcares e a distribuição dos sulfatos na cadeia de açúcares (Dürig e col.,1997, Sezer e Cevher, 2011).

No nosso grupo de investigação (3B's Research Group) estão a ser estudadas em particular duas atividades biológicas: atividade anti-tumoral e redução de glicose no sangue. Nos próximos pontos serão evidenciadas estas duas propriedades.

Propriedades anti-tumorais

Estudos *in vitro* indicam que a fucoídiana protege o organismo contra vários tipos de cancro, nomeadamente leucemia, cancro do colon, cancro da mama, cancro do pulmão e melanomas (Ferlay e col.,2013). Apesar dos efeitos reais e mecanismo de ação da fucoídiana quando aplicado em contexto de cancro serem ainda desconhecidos, estudos demonstraram que a fucoídiana inibe o crescimento de tumores induzindo citotoxicidade e apoptose das células cancerígenas, assim como interrompe o ciclo celular. Além disso, inibe a formação de metástases e potencia o efeito tóxico de outros compostos químicos. Pode ainda afetar as células cancerígenas indiretamente, através do controlo da atividade angiogénica (Kwak, 2014, Atashrazm e col., 2015). Apesar destes efeitos, existem preocupações relacionadas com a citotoxicidade que induz nas células não-tumorais, a não reprodutibilidade de resultados e, além disso, nem todas as fucoídanas apresentam atividade anti-tumoral. As verdadeiras razões para tal acontecimento não estão ainda completamente clarificadas, sendo que poderá estar relacionado com vários fatores tais como o peso molecular, o grau de sulfatação, o método de extração e os componentes de açúcar (Ale e col., 2011). A base destas estratégias anti-cancerígenas baseia-se no pressuposto de eliminar os tumores sem afetar os tecidos saudáveis, sendo deste modo necessário investir em terapias direcionadas no ataque unicamente ao tumor, possibilitando um tratamento mais efetivo (Figura 6).

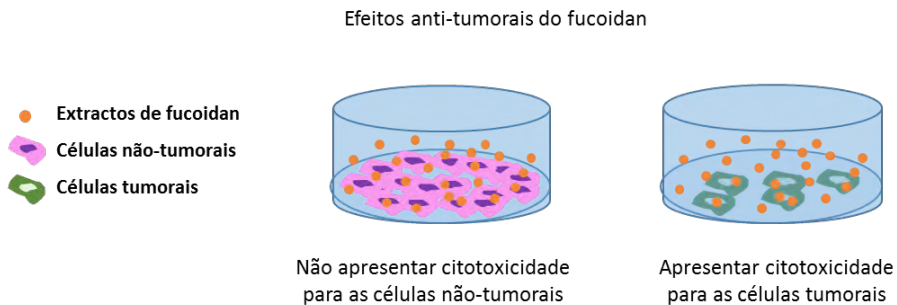


Figura 6. Efeitos desejados da aplicação da fucoidana quando em cultura com células tumorais e células não-tumorais.

Redução da glicose no sangue

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* propõem a aplicação da fucoidana na redução da glicose no sangue (Kim e col., 2014, Vinoth-Kumar e col., 2015). Para além disso, na literatura existem já alguns trabalhos que mostram o potencial antidiabético de extractos de algas, entre as quais as algas castanhas (Wang e col., 2014). Contudo, ainda não foi investigado em detalhe o efeito da fucoidana na hiperglicemia em diabetes. Kui-Jin Kim e seus colegas demonstraram que a fucoidana de peso molecular baixo previne hiperglicemia em ratos diabéticos, apontando que a redução da glicose seja dependente do peso molecular da fucoidana (Kim e col., 2014). Por outro lado, tem sido referida a relação desta capacidade de redução da glicose no sangue com a inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase durante a digestão de carboidratos. No processo de digestão de uma dieta rica em carboidratos, as enzimas α -glucosidase e α -amilase têm um papel muito importante. A inibição destas enzimas reduz a digestão de oligossacarídeos e dissacarídeos, levando a um atraso na produção de glicose. Por conseguinte, observa-se uma redução de glicose no plasma, resultando finalmente numa supressão de hiperglicemia após a ingestão. Esta ação da fucoidana sobre as enzimas referidas parece estar relacionada com a espécie de alga e período de apanha das mesmas, o que influenciará as propriedades da fucoidana extraída dessas algas. Ainda assim, esse mecanismo de inibição das enzimas pela fucoidana poderá desempenhar um papel relevante no tratamento de diabetes mellitus tipo I e II.

Tabela 2. Propriedades bioativas da fucoidana e possíveis aplicações na área biomédica

Actividades biológicas	Fonte	Possíveis aplicações	Referência
Antioxidante	<i>E. cava</i> <i>F. evanescens</i> <i>P. gymnospora</i> <i>A. nodosum</i> <i>S. fulvellum</i>	Prevenção de atividade antioxidante; ajuda em doenças que necessitam de radicais livres	(Li e col., 2008)
Antitumoral	<i>U. pinnatifida</i> <i>E. cava</i> <i>F. evanescens</i> <i>L. guryanovae</i>	Agente inibidor da proliferação de células tumorais	(Li e col., 2008, Sezer e Cevher, 2011)
Anti inflamatório	<i>L. japonica</i> <i>E. cava</i>	Inibição de leucócitos utilizado como modelo inflamatório	(Li e col., 2008, Sezer e Cevher, 2011)
Anticoagulante	<i>E. cava</i> <i>F. evanescens</i> <i>Hizikia fusiforme</i>	Elevada atividade anti-coagulante mediante a antitrombina e/ou heparina cofactor II	(Ponce e col., 2003, Wijesekara e col., 2011)
Anti-vírico	<i>L. japonica</i> <i>A. utricularis</i> <i>U. pinnatifida</i> <i>Stochoplimum</i>	Inibição de alguns tipos de vírus	(Mandal e col., 2007)
Redução de lípidos no sangue	<i>L. japonica</i> <i>E. stolonifera</i> <i>S. robusta</i> <i>F. vesiculosus</i> <i>E. cottonii</i>	Redução do colesterol	(Li e col., 2008, Silva e col., 2012, Wijesinghe e Jeon, 2012)
Anti-hiperglicemia	<i>E. stolonifera</i> <i>P. bagingtoni</i> <i>A. nodosum</i>	Ajuda no tratamento de diabetes tipo II	(Mourão, 2004)

Antimicrobiano (bactérias e fungos)	<i>D. humifusa</i> <i>A. orientalis</i> <i>G. acerosa</i> <i>H. species</i> <i>S. robusta</i>	Efeito inibidor e bactericida sobre alguns tipos de fungos/bactérias	(Mourão, 2004)
-------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------	----------------

3.3 Preparação de sistemas poliméricos à base de fucoidana

A fucoidana apresenta elevada solubilidade em água, que se torna um problema para a produção de estruturas estáveis em meio aquoso usando a fucoidana de forma isolada. De modo a solucionar este problema, têm sido propostas misturas ou compósitos de fucoidana com outras macromoléculas naturais ou sintéticas, tais como seda (Cheng, 2009), quitosano (Sezer e col., 2007, Murakami e col., 2010) e hidroxiapatite (Jeong e col., 2013). Para além disso, têm também sido usadas diferentes tecnologias para a produção destes materiais, como por exemplo: eletrofiação (Lee e col., 2012), evaporação por solvente (Sezer e col., 2007) e complexação de polieletrólitos (Nakamura e col., 2008). Na Tabela 3 podemos ver algumas das aplicações da fucoidana com outros materiais.

Modificação/fotopolimerização da fucoidana

Na literatura existem alguns trabalhos que referem a modificação de polímeros sulfatados por metacilação, de forma a obterem estruturas possíveis de serem aplicadas na área biomédica usando a técnica de fotorreticulação (Baier-Leach e col., 2003, Li e col., 2004, Amsden e col., 2007, Mihaila e col., 2013). A metacilação de polímeros naturais com anidrido metacrílico é uma nova estratégia para a produção de estruturas de polissacarídeos fotorreticulados. Este tipo de modificação permite a incorporação de grupos fotorreativos, de tal forma que na presença de luz a formação de ligações inter-moleculares é promovida, resultando em sistemas macromoleculares insolúveis em água e outros solventes (Li e col., 2003). Deste modo, a hipótese de modificar a fucoidana por metacilação e posteriormente obter estruturas por fotorreticulação foi investigada (Reys e col., 2015a). Este estudo consistiu em testar diferentes concentrações de fucoidana, anidrido metacrílico e duração da reação de

modificação, tendo-se obtido fucoídana metacrilada, com diferentes graus de metacrilção (Reys e col., 2015a).

Partículas por fotorreticulação

No nosso grupo foram preparadas partículas de fucoídana a partir de fucoídana metacrilada e recorrendo a fotorreticulação usando radiação visível, usando a metodologia ilustrada na Figura 7. Superfícies super-hidrofóbicas foram usadas para produzir partículas a partir de gotas das soluções iniciais de fucoídana, uma vez que a repulsão da solução pelas referidas superfícies permite manter a forma aproximadamente esférica das partículas, tirando assim partido de uma tecnologia previamente desenvolvida no nosso grupo de investigação pela equipa do Prof. João F. Mano (Rial-Hermida e col., 2014). A fucoídana metacrilada foi então combinada com um fotoiniciador citocompatível (eosina e trietanolamina) (Baroli, 2006) e a solução resultante foi depositada gota-a-gota sobre as superfícies super-hidrofóbicas (com diferentes volumes), sendo posteriormente expostas a radiação da gama do visível. Foram testadas diferentes condições de forma a otimizar parâmetros de produção, tais como a concentração da fucoídana metacrilada e fotoiniciador, tempo de exposição à radiação e volumes a serem usados. Foram produzidas desta forma partículas de tamanho entre 0'6 e 1'3 mm, dependendo do volume depositado nas referidas superfícies. A vantagem da utilização deste método é ser possível obter estruturas de fucoídana sem a necessidade de incorporação de um outro polímero, podendo tirar melhor partido das propriedades bioativas da fucoídana. As partículas permitem a cultura celular, nomeadamente de fibroblastos que foram capazes de proliferar e migrar para o interior das partículas (Figura 8), podendo ser posteriormente utilizadas como sistema de libertação controlada ou para encapsulamento celular, de acordo com trabalhos em desenvolvimento.

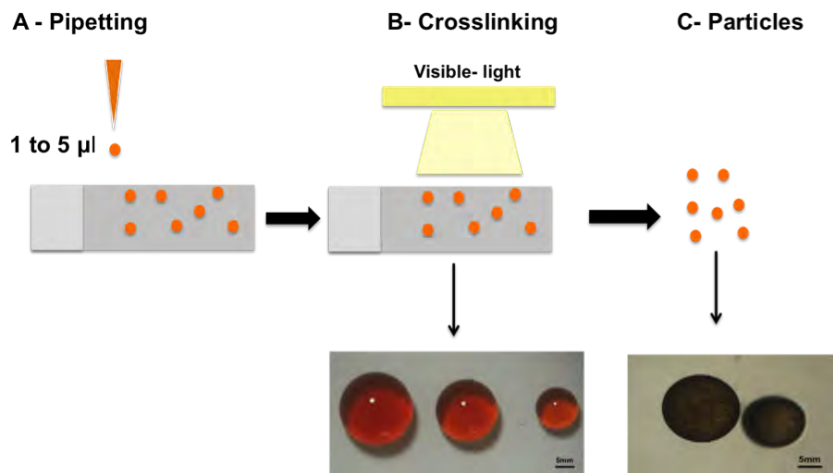


Figura 7. Método de preparação das partículas de fucoídano metacrilatado por fotorreticulação.

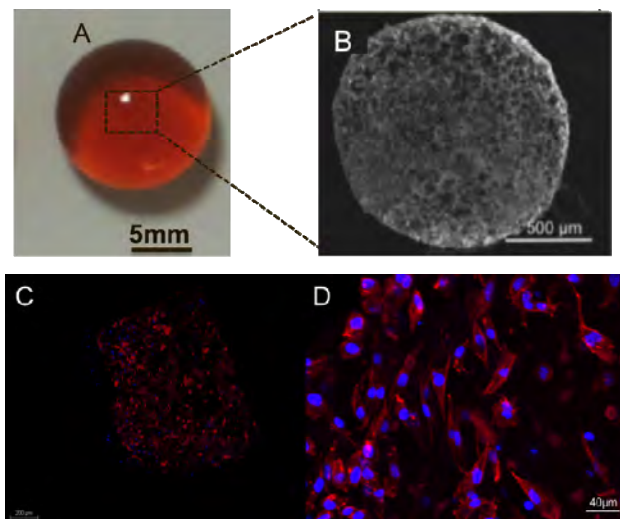


Figura 8. Fotos das micropartículas de fucoídano metacrilatado (A), Imagem de SEM de uma micropartícula de fucoídano metacrilatado (B) e Imagens de confocal das micropartículas de fucoídano metacrilatado cultivado com fibroblastos (L929) (C,D).

Nanopartículas da fucoídano e do quitosano

Nanopartículas de fucoídano e quitosano podem ser preparadas através do método de complexação de polieletrólitos, recorrendo à atração eletrostática entre as cargas opostas dos dois polímeros de origem

marinha. O quitosano apresenta carga positiva, sendo combinado com a fucoídana que apresenta carga negativa. O polianião é adicionado, gota-a-gota, na solução de quitosano, ocorrendo uma formação espontânea das nanopartículas (Figura 9). Foram testadas diferentes condições experimentais de produção, tais como a concentração e rácio dos polímeros, o pH, o tempo de agitação e ainda a força iónica das soluções de polímeros, de forma a avaliar a sua influência em diversos parâmetros, nomeadamente o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta (relacionado com a carga superficial) das nanopartículas. O tamanho das partículas variou consoante os diferentes parâmetros utilizados, sendo que concentrações mais baixas de polímeros davam origem a partículas mais pequenas. O aumento de rácio, que leva a um excesso de fucoídana, fez com que o potencial das nanopartículas passasse a ser negativo, enquanto que a interação dos polímeros em iguais quantidades originou nanopartículas com carga positiva, característica do maior teor de quitosano na superfície das partículas. A seleção das condições de produção poderá ser utilizada para dar origem a partículas com um determinado tamanho e carga superficial, de acordo com a aplicação equacionada para essas nanopartículas.

A estabilidade das nanopartículas, após a sua formação, foi também estudada, com diferentes concentrações de PBS, sendo que estas se revelaram estáveis quando testadas em condições fisiológicas. Este tipo de sistemas tem aplicação em estratégias de libertação controlada de fármacos (Huang e col., 2014, Huang e Li 2014), nomeadamente em abordagens intra-celulares, podendo também ser exploradas em particular em contextos de terapias contra o cancro, quer através do transporte direcionado de fármacos anti-tumorais, quer tirando partido do potencial anti-tumoral exibido pela fucoídana (Oliveira e col., *submetido*).

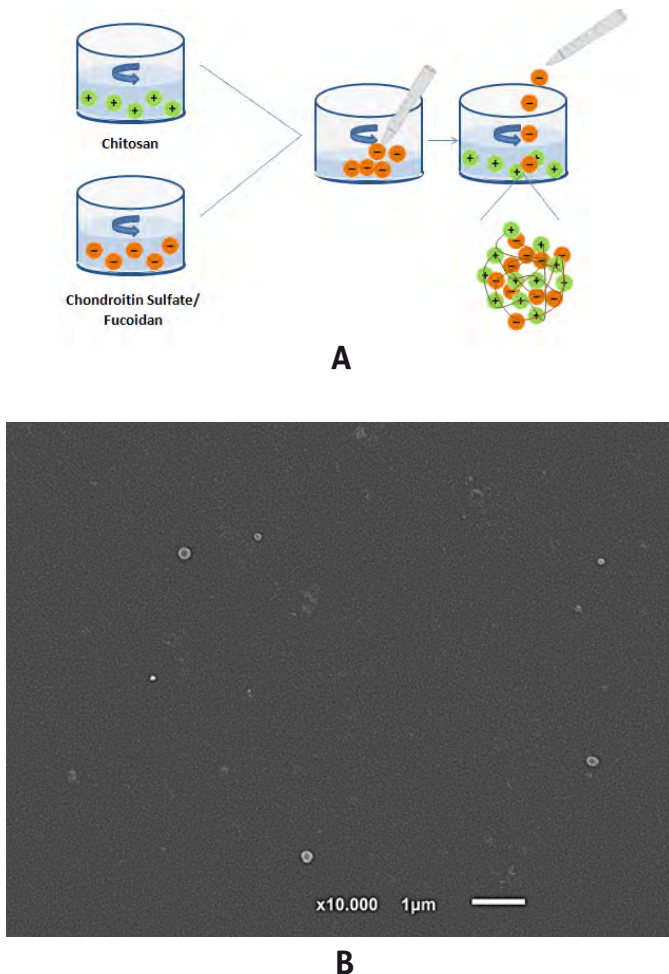


Figura 9. (A) Método de preparação de nanopartículas de quitosano e fucoídano (esquerda) e (B) imagem de microscopia eletrônica de varredura das nanopartículas produzidas.

3.4 Aplicações

A fucoídano já é usada há milhares de anos na Ásia em diferentes aplicações, embora essa designação e a sua obtenção com maior grau de pureza sejam relativamente recentes. Nos últimos anos a sua investigação tem sido centrada sobretudo em países como Japão, Austrália e Estados Unidos (Shibata e col., 2000). Este polissacarídeo sulfatado tem demonstrado um enorme sucesso em diferentes indústrias tais como: cosmética, agricultura,

farmácia e aplicações na área médica (Choi e col., 2010). As principais áreas de aplicação são (Courtois, 2009):

- indústria alimentar: fibras dietéticas, redução de colesterol e bebidas desportivas;
- indústria cosmética: esfoliantes para a pele, tratamento de acne, hidratação do cabelo e pasta dos dentes;
- agricultura: fertilizantes para plantas;
- tratamento de água: remoção de iões metálicos;
- área biomédica: anticoagulante, antiviral e regulador da ação imunológica.

O uso da fucoídano na área biomédica tem vindo a crescer a passos largos tirando vantagem das suas propriedades biológicas e estruturais. Desta forma as propriedades anti-coagulante (Sezer e Cevher, 2011), anti-inflamatória (Sezer e Cevher, 2011), anti-viral e anti-bacteriana têm vindo a ser muito estudadas em diferentes doenças (Li e col., 1995, Li e col., 2008). Para além das aplicações mencionadas, a fucoídano tem vindo a ser testada no tratamento de doenças neurodegenerativas, no fluxo renal, no tratamento de alguns cancros e no tratamento da diabetes mellitus (Kim e col., 2012). Este polissacarídeo tem também vindo a ser aplicado no tratamento de algumas doenças víricas, nomeadamente o vírus da gripe, vírus da hepatite C e vírus da herpes (Li e col., 2008). Estruturas 3D tais como fibras, filmes e estruturas porosas à base de fucoídano e outros materiais têm sido sugeridos para aplicação na área biomédica, nomeadamente na regeneração dos tecidos do osso e na libertação controlada de fármacos (Sezer e col., 2007, Murakami e col., 2010, Lee e col., 2012). As estruturas mencionadas foram obtidas usando diferentes metodologias como: prototipagem rápida, electrofiação e evaporação de solventes (Cheng, 2009, Wijesekara e col., 2011, Lee e col., 2012). A fucoídano também tem vindo a ser usada em aplicações ligadas à nanomedicina como a libertação controlada de compostos bioativos, sendo usada como revestimento de nanopartículas ou misturada com outros materiais. Na Tabela 3 estão listadas algumas das aplicações mais relevantes da fucoídano na área biomédica.

Tabela 3. Aplicações biomédicas da fucoídana combinada com diferentes materiais.

Composição	Tipo de matriz	Potenciais aplicações	Ref.
Alginato, Quitina/ Quitossano/ fucoídana	Membranas	Cicatrização de feridas	(Mourão, 2004)
Carboximetil Cur- dlan/ fucoídana	Nanopartículas	Aplicações biomédicas e farmacêuticas	(Mandal e col., 2007)
Fucoídana/Quitossano	Nanopartículas	Libertação de fármacos	(Maruyama e col., 2005)
		Sistemas de libertação oral	(Huang e Lam, 2011)
	Hidrogéis	Feridas dérmicas	(Sezer e col., 2007)
	Fibras porosas	Cicatrização de feridas	(Murakami e col., 2010)
	Microesferas	Libertação controlada	(Kitamura e col., 1991)
Queimaduras dérmicas		(Rodríguez- Jasso e col., 2011)	
Hidroxiapatite/fu- coídana	Compósitos	Regeneração do tecido ósseo	(Jeong e col., 2013)
PCL/Fucoídana	Estruturas poro- sas micro/nano- fibras	Regeneração do tecido ósseo	(Lee e col., 2012)
	Estruturas poro- sas 3D	Regeneração do tecido ósseo	(Jin e Kim, 2011)

Fucoidana/PET	Melhoramento da adesão superficial	Implantes vasculares	(Ponce e col., 2003)
pHEMA/fucoidana/MAA	Hidrogel	Biofilme óptico	(Pomin e col., 2005)
Fucoidana/fibroína da seda	Membranas	Estancamento de sangue	(Cheng, 2009)

Abreviaturas: MAA – ácido metacrilato; pHEMA – poli(2-hidroxietilmetacrilato); PET – Poli(etilenoteraftalato); PCL – Policaprolactona.

4. Considerações finais

O quitosano e a fucoidana foram abordados em particular como exemplos de polissacarídeos marinhos com função estrutural nos seus organismos de origem. São ambos estruturalmente semelhantes aos glicosaminoglicanos presentes na matriz extracelular, particularmente abundantes no caso da cartilagem, prometendo assim um elevado grau de aplicação em estratégias de engenharia de tecidos para terapêuticas de medicina regenerativa. Na sua composição contam com açúcares específicos que lhes conferem propriedades particulares. No caso do quitosano, verifica-se a presença de glucosamina, cujos grupos amina livres podem ser protonados em meio ácido, conferindo ao polímero carga positiva, sendo provavelmente o único policatião natural conhecido. Por outro lado, a fucoidana possui fucoses sulfatadas que lhe conferem carga altamente negativa e propriedades biológicas significativas.

Para além disso, o seu papel como polímeros com funções estruturais tem motivado a sua utilização em sistemas tridimensionais para aplicação biomédica, tal como referido em cima. Foram referidos em particular partículas e membranas com potencial aplicação no transporte

e libertação controlada de fármacos e outros compostos bioactivos, bem como partículas, hidrogéis e matrizes porosas tridimensionais para cultura de diferentes tipos de células visando a regeneração de tecidos, nomeadamente osso, cartilagem, pele, do sistema nervoso periférico e vascular.

Ficou desta forma demonstrado o seu elevado interesse para a área biomédica, que tem inspirado cientistas de diferentes origens para o desenvolvimento de sistemas que possam vir a constituir soluções terapêuticas para diferentes patologias. Para tal é importante que, nestes trabalhos de regeneração de tecidos humanos, a interação dos cientistas com o pessoal médico seja reforçada de forma a que as estratégias de trabalho possam ser alinhadas em sinergias com sucesso na melhoria da qualidade de vida dos pacientes e população em geral. Por outro lado, em particular nestes estudos com polissacarídeos de origem marinha, é necessário desenvolver tecnologias que permitam a produção dos biopolímeros com elevada pureza, de forma reprodutível e sustentável, bem como no que diz respeito ao seu processamento para a obtenção dos sistemas com potencial terapêutico atrás referidos. Só dessa forma será possível procurar aumentos de escala de produção, quer dos biopolímeros de nível farmacêutico ou médico, quer dos sistemas biomédicos, para que o seu custo possa ser comportável e a sua entrada no mercado e na prática clínica possa vir a ser uma realidade. É um futuro ainda longínquo mas estão a ser dados passos seguros. Neste momento, é altura de demonstrar a sua eficácia em ensaios pré-clínicos em modelos animais e em ensaios clínicos e é nisso que estamos a apostar.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro do FEDER através do Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha Portugal 2007-2013 (POCTEP) no âmbito do projeto 0687_NOVOMAR_1_P e através do Programa Operacional Regional do Norte (ON.2) no âmbito do Programa Integrado NORTE-01-0124-FEDER-000018. O apoio financeiro do Sétimo Programa Quadro de Investigação e Desenvolvimento da União Europeia, no âmbito do projeto REGPOT-CT2012-316331-POLARIS, e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia no âmbito do projeto EXPL/MAR-BIO/0165/2013 CarbPol_μ_Algae é também agradecido.

Referências bibliográficas

- Ale M. T., Mikkelsen J. D., Meyer A. S. (2011) Important determinants for fucoidan bioactivity: a critical review of structure-function relations and extraction methods for fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds. *Marine Drugs*, 9: 2106-2130.
- Alves N. M. e Mano J. F. (2008) Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 401-414.
- Amsden B. G., Sukarto A., Knight D. K., Shapka S. N. (2007) Methacrylated glycol chitosan as a photopolymerizable biomaterial. *Biomacromolecules*, 8: 3758-3766.
- Aranaz I., Mengibar M., Harris R., Paños I., Miralles B. e col. (2009) Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3: 203-230.
- Atashrazm F., Lowenthal R. M., Woods G. M., Holloway A. F., Dickinson J. L. (2015) Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential. *Marine Drugs*, 13: 2327-2346.
- Baier-Leach J., Bivens K. A., Patrick Jr. C. W., Schmidt C. E. (2003) Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds. *Biotechnology and Bioengineering*, 82: 578-589.
- Baroli B. (2006) Photopolymerization of biomaterials: issues and potentialities in drug delivery, tissue engineering, and cell encapsulation applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81: 491-499.
- Bhalerao U. M., Valiveti A. K., Acharya J., Halve A. K., Kaushik M. P. (2015) Controlled release studies of antimalarial 1, 3, 5-trisubstituted-2-pyrazolines from biocompatible chitosan-heparin Layer-by-Layer (LbL) self assembled thin films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 125: 151-159.
- Bigucci F., Abruzzo A., Vitali B., Saladini B., Cerchiara T., Gallucci M. C., Luppi B. (2015) Vaginal inserts based on chitosan and carboxymethylcellulose complexes for local delivery of chlorhexidine: preparation, characterization and antimicrobial activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 478: 456-463.
- Calinescu C., Mondovi B., Federico R., Ispas-Szabo P., Mateescu M. A. (2012) Carboxymethyl starch: chitosan monolithic matrices containing diamine oxidase and catalase for intestinal delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 428: 48-56.
- Campana-Filho S. P., Britto D. D., Curti E., Abreu F. R., Cardoso M. B. e col. (2007) Extração, estruturas e propriedades de a- e b-quitina. *Química Nova*, 30: 644-650.
- Cheng Y. H., Hung K. H., Tsai T. H., Lee C. J., Ku R. Y. e col. (2014a) Sustained delivery of latanoprost by thermosensitive chitosan-gelatin-based hydrogel for controlling ocular hypertension. *Acta Biomaterialia*, 10: 4360-4366.
- Cheng Z. H., Huang J., Hu S., Jiang C. J., Ge Q. e col. (2014b) Effects of hydroxypropyl degree on physicochemical activities of chitosan from squid pens. *International Journal of Biological Macromolecules*, 65: 246-251.

- Cheng Z. L. (2009) Physical and chemical characteristics of silk fibroin/fucoïdan composite films. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 13: 1589-1592.
- Chizhov A. O., Dell A., Morris H. R., Haslam S. M., McDowell R. A. e col. (1999) A study of fucoïdan from the brown seaweed *Chorda filum*. *Carbohydrate Research*, 320: 108-119.
- Choi J. I., Raghavendran H. R., Sung N. Y., Kim J. H., Chun B. S. e col. (2010) Effect of fucoïdan on aspirin-induced stomach ulceration in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 183: 249-254.
- Correia C., Moreira-Teixeira L., Moroni L., Reis R. L., Van Blitterswijk C. A., Karperien M. e Mano J. F. (2011) Chitosan Scaffolds Containing Hyaluronic Acid for Cartilage Tissue Engineering *Tissue Engineering Part C: Methods* 17: 717-730.
- Correlo V. M., Boesel L. F., Pinho E., Costa-Pinto A. R., Alves da Silva M. L. e col. (2009) Melt-based compression-molded scaffolds from chitosan-polyester blends and composites: morphology and mechanical properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 91: 489-504.
- Correlo V. M., Pinho E. D., Pashkuleva I., Bhattacharya M., Neves N. M. e col. (2007) Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. *Macromolecular Bioscience*, 7: 354-363.
- Costa-Pinto A. R., Martins A. M., Castelhana-Carlos M. J., Correlo V. M., Sol P. C. e col. (2014) In vitro degradation and in vivo biocompatibility of chitosan-poly(butylene succinate) fiber mesh scaffolds. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers: Biomedical Applications*, 29: 137-151.
- Courtois J. (2009) Oligosaccharides from land plants and algae: production and applications in therapeutics and biotechnology. *Current Opinion in Microbiology*, 12: 261-263.
- Coutinho D. F., Sant S., Shakiba M., Wang B., Gomes M. E. e col. (2012) Microfabricated photocrosslinkable polyelectrolyte-complex of chitosan and methacrylated gellan gum. *Journal of Materials Chemistry*, 22: 17262-17271.
- d'Áyala G. G., Malinconico M., Laurienzo P. (2008) Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*, 13: 2069-2106.
- Dhandayuthapani B., Krishnan U. M., Sethuraman S. (2010) Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 94: 264-272.
- Dimzon I. K. D., Ebert J., Knepper T. P. (2013) The interaction of chitosan and olive oil: effects of degree of deacetylation and degree of polymerization. *Carbohydrate Polymers*, 92: 564-570.
- Duarte A. R. C., Mano J. F., Reis R. L. (2010) Novel 3D scaffolds of chitosan-PLLA blends for tissue engineering applications: preparation and characterization. *The Journal of Supercritical Fluids*, 54: 282-289.

- Duarte M. E. R., Cardoso M. A., Nosedá M. D., Cerezo A. S. (2001) Structural studies on fucoidans from the brown seaweed *Sargassum stenophyllum*. *Carbohydrate Research*, 333: 281-293.
- Dürig J., Bruhn T., Zurborn K. H., Gutensohn K., Bruhn H. D. e col. (1997) Anticoagulant fucoidan fractions from *Fucus Vesiculosus* induce platelet activation in vitro. *Thrombosis Research*, 85: 479-491.
- Dutta P. K., Dutta J., Tripathi V. S. (2004) Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63: 20-31.
- Evans J., Davids W., MacRae J., Amirbahman A. (2002) Kinetics of cadmium uptake by chitosan-based crab shells. *Water Research*, 36: 3219-3226.
- Ferlay J. S., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S. e col. (2013). Cancer incidence and mortality worldwide: GLOBOCAN 2012 v1.0. F. IARC Cancer Base No. 11. International Agency for Research on Cancer: Lyon.
- Ferreira C. S., Caridade S. G., Mano J. F., Alves N. M. (2014) Homogeneous poly(L-lactic acid)/chitosan blended films. *Polymers for Advanced Technologies*, 25: 1492-1500.
- Florczyk S. J., Wang K., Jana S., Wood D. L., Sytsma S. K. e col. (2013) Porous chitosan-hyaluronic acid scaffolds as a mimic of glioblastoma microenvironment ECM. *Biomaterials*, 34: 10143-10150.
- Foley A. S., Mulloy B., Tuohy M. G. (2001) An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*: extraction, characterization, and apoptotic effects in Vitro. *Journal of Natural Products*, 74: 1851-1861.
- Francis N. L., Hunger P. M., Donius A. E., Wegst U. G. K., Wheatley M. A. (2014) Strategies for neurotrophin-3 and chondroitinase ABC release from freeze-cast chitosan-alginate nerve-guidance scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, doi: 10.1002/term.1912.
- Gasparini L., Mano J. F., Reis R. L. (2014) Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of the Royal Society Interface*, 11: 20140817.
- Hahn T., Lang S., Ulber R., Muffler K. (2012) Novel procedures for the extraction of fucoidan from brown algae. *Process Biochemistry*, 47: 1691-1698.
- Haugh M. G., Murphy C. M., O'Brien F. J. (2010) Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes. *Tissue Engineering Part C Methods*, 16: 887-894.
- Hermans K., Van den Plas D., Kerimova S., Carleer R., Adriaensens P. e col. (2014) Development and characterization of mucoadhesive chitosan films for ophthalmic delivery of cyclosporine A. *Int J Pharm.* 472: 10-19.
- Hsieh B. C., Cheng T. J., Wang T. Y., Chen R. (2003) Use of chitosan membrane from the carapace of the soldier crab *Mictyris brevidactylus* for biosensor construction. *Marine Biotechnology*, 5: 119-125.
- Huang Y. C., Chen J. K., Lam U. I., Chen S. Y. (2014) Preparing, characterizing, and evaluating chitosan/fucoidan nanoparticles as oral delivery carriers. *Journal of Polymer Research*, 21: 1-9.

- Huang Y. C., Lam U. I. (2011) Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58: 779-785.
- Huang Y. C., Li R. Y. (2014) Preparation and characterization of antioxidant nanoparticles composed of chitosan and fucoidan for antibiotics delivery. *Marine Drugs*, 12: 4379-4398.
- Huang Y. J., Hsu S. H. (2014) Acquisition of epithelial–mesenchymal transition and cancer stem-like phenotypes within chitosan-hyaluronan membrane-derived 3D tumor spheroids. *Biomaterials*, 35: 10070-10079.
- Jayakumar R., Menon D., Manzoor K., Nair S. V., Tamura H. (2010) Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - a short review. *Carbohydrate Polymers*, 82: 227-232.
- Jeong H. S., Venkatesan J., Kim S. K. (2013) Hydroxyapatite-fucoidan nanocomposites for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 57: 138-141.
- Jin G., Kim G. H. (2011) Rapid-prototyped PCL/fucoidan composite scaffolds for bone tissue regeneration: design, fabrication, and physical/biological properties. *Journal of Materials Chemistry*, 21: 17710-17718.
- Jung J., Zhao Y. (2014) Alkali- or acid-induced changes in structure, moisture absorption ability and deacetylating reaction of *Dosidicus gigas* pens. *Food Chemistry*, 152: 355-362.
- Kievit F. M., Florczyk S. J., Leung M. C., Wang K., Wu J. D. e col. (2014) Proliferation and enrichment of CD133+ glioblastoma cancer stem cells on 3D chitosan-alginate scaffolds. *Biomaterials*, 35: 9137-9143.
- Kim B. S., Mooney D. J. (1998) Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 16: 224-230.
- Kim K. J., Yoon K. Y., Lee B. Y. (2012) Fucoidan regulate blood glucose homeostasis in C57BL/KSJ m+/+db and C57BL/KSJ db/db mice. *Fitoterapia*, 83: 1105-1109.
- Kim K. T., Rioux L. E., Turgeon S. L. (2014) Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*, 98: 27-33.
- Kitamura K., Matsuo M. M., Yasui T. (1991) Fucoidan from brown seaweed *Laminaria angustata* var. *longissima*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 55: 615-616.
- Kwak J. Y. (2014) Fucoidan as a marine anticancer agent in preclinical development. *Marine Drugs*, 12: 851-870.
- Langer R., Vacanti J. P. (1993) Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926.
- Lee J. S., Jin G. H., Yeo M. G., Jang C. H., Lee H., Kim G. H. (2012) Fabrication of electrospun biocomposites comprising polycaprolactone/fucoidan for tissue regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 90: 181-188.
- Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. (2008) Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13: 1671-1695.

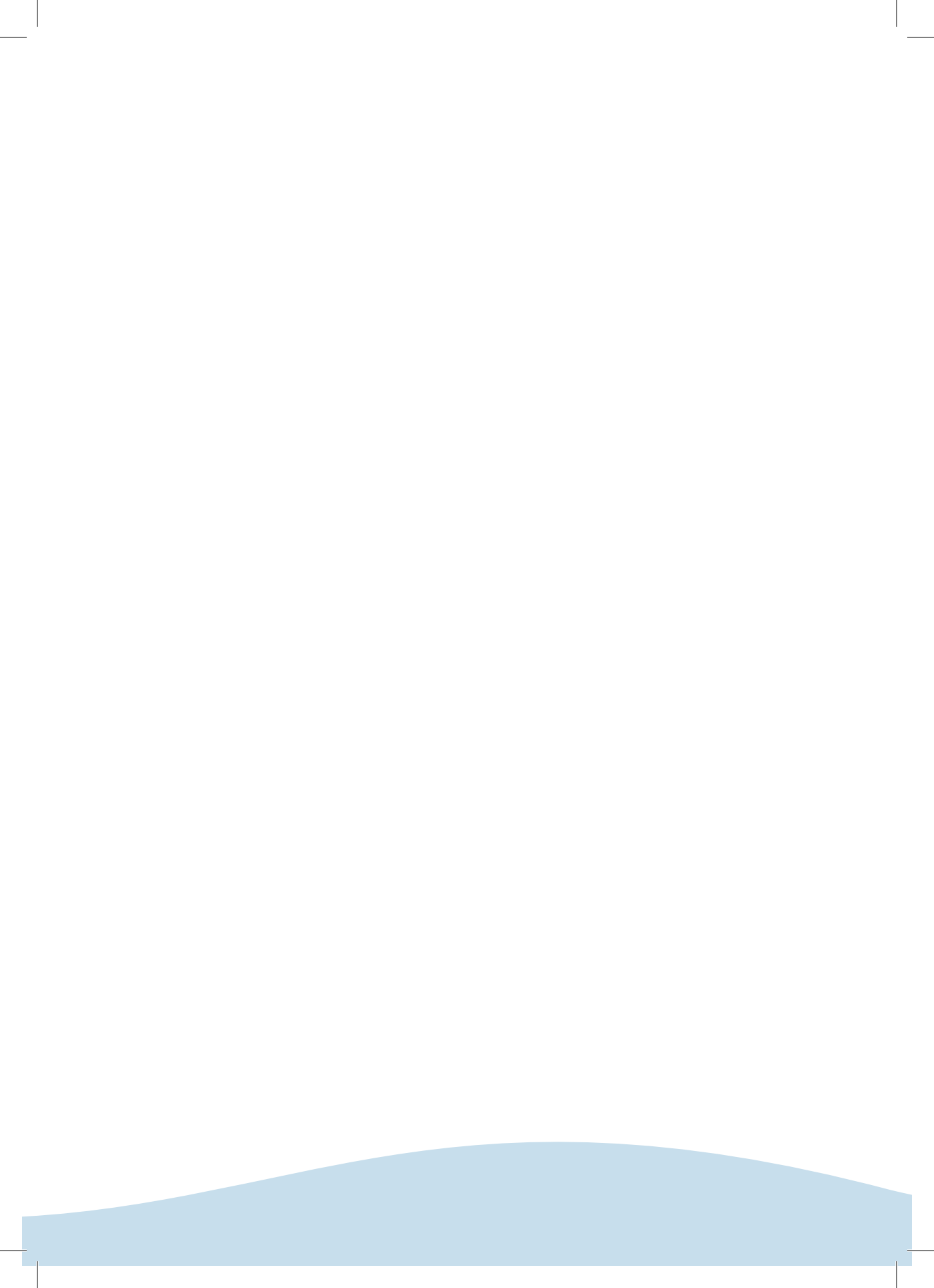
- Li F., Tian T., Shi Y., Liu Y., Zhang S. (1995) Study on anti-virus effect of fucoïdan in vitro. *Baïquien Yike Daxue Xuebao*, 21: 255-257.
- Li Q., Wang D.-a. e Elisseeff J. H. (2003) Heterogeneous-phase reaction of glycidyl methacrylate and chondroitin sulfate: mechanism of ring-opening-transesterification competition. *Macromolecules*, 36: 2556-2562.
- Li Q., Williams C. G., Sun D. D. N., Wang J., Leong K. e col. (2004) Photocrosslinkable polysaccharides based on chondroitin sulfate. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 68: 28-33.
- Mak W. W. F. (2012) Extraction, characterization and antioxidant activity of fucoïdan from New Zealand *Undaria pinnatifida* (Harvey) suringar. *Masther of Applied Science, Auckland University of Technology*. 104 p.
- Malafaya P. B., Pedro A. J., Peterbauer A., Gabriel C., Redl H. e col. (2005) Chitosan particles agglomerated scaffolds for cartilage and osteochondral tissue engineering approaches with adipose tissue derived stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16: 1077-1085.
- Mandal P., Mateu C. G., Chattopadhyay K., Pujol C. A., Damonte E. B. e col. (2007) Structural features and antiviral activity of sulphated fucans from the brown seaweed *Cystoseira indica*. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 18: 153-162.
- Mano J. F. e Reis R. L. (2007) Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1: 261-273.
- Mano J. F., Silva G. A., Azevedo H. S., Malafaya P. B., Sousa R. A. (2007) Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *Journal of the Royal Society Interface*, 4: 999-1030.
- Maoka T. (2011) Carotenoids in Marine Animals. *Marine Drugs*, 9: 278-293.
- Martins A. M., Eng G., Caridade S. G., Mano J. F., Reis R. L. e col. (2014) Electrically conductive chitosan/carbon scaffolds for cardiac tissue engineering. *Biomacromolecules*, 15: 635-643.
- Maruyama H., Tamauchib H., Hashimoto M., Nakano T. (2005) Suppression of Th2 immune responses by Mekabu fucoïdan from *Undaria pinnatifida* Sporophylls. *International Archives of Allergy and Immunology*, 137: 289-294.
- Mihaila S. M., Gaharwar A. K., Reis R. L., Marques A. P., Gomes M. E. e Khademhosseini A. (2013) Photocrosslinkable kappa-carrageenan hydrogels for tissue engineering applications. *Advanced Healthcare Materials*, 2: 895-907.
- Mota J., Yu N., Caridade S. G., Luz G. M., Gomes M. E. e col. (2012) Chitosan/bioactive glass nanoparticle composite membranes for periodontal regeneration. *Acta Biomaterialia*, 8: 4173-4180.
- Mourão P. A. S. (2004) Use of sulfated fucans as anticoagulant and antithrombotic agents: future perspectives. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 967-981.

- Murakami K., Aoki H., Nakamura S., Nakamura S. I., Takikawa M. e col. (2010) Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 31: 83-90.
- Nagaoka M., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K. e col. (1999) Structural study of fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA. *Glycoconjugate Journal*, 16: 19-26.
- Nakamura S., Nambu M., Ishizuka T., Hattori H., Kanatani Y. e col. (2008) Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoidan micro complex hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85: 619-627.
- Neves S. C., Moreira-Teixeira L. S., Moroni L., Reis R. L., Van Blitterswijk C. A. e col. (2011) Chitosan/Poly(ϵ -caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials*, 32: 1068-1079.
- Oliveira J. M., Rodrigues M. T., Silva S. S., Malafaya P. B., Gomes M. E. e col. (2006) Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, 27: 6123-6137.
- Oliveira C., Martins A., Neves N. M., Silva T. H., Reis R. L. (2015) Antitumoral potential of fucoidan extracts envisaging therapeutics against breast cancer. *Submetido*.
- Passaquet C., Thomas J. C., Caron L., Hauswirth N., Puel F. e col. (1991) Light-harvesting complexes of brown algae. Biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Letters*, 280: 21-26.
- Pomin V. H., Valente A. P., Pereira M. S., Mourão P. A. S. (2005) Mild acid hydrolysis of sulfated fucans: a selective 2-desulfation reaction and an alternative approach for preparing tailored sulfated oligosaccharides. *Glycobiology*, 15: 1376-1385.
- Ponce N. M. A., Pujol C. A., Damonte E. B., Flores M. L., Stortz C. A. (2003) Fucoidans from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate Research*, 338: 153-165.
- Renn D. W. (1984) Agar and agarose: indispensable partners in biotechnology. *Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development*, 23: 17-21.
- Reys L. L., Silva S. S., Costa D. S., Oliveira N. M., Mano J. F. e col. (2015a) Photocrosslinkable fucoidan by visible light for tissue engineering applications. *Submetido*.
- Reys L. L., Silva S. S., Oliveira J. M., Caridade S. G., Mano J. F. e col. (2013) Revealing the potential of squid chitosan-based structures for biomedical applications. *Biomedical Materials*, 8: 045002.
- Reys L. L., Silva S. S., Pirraco R. P., Marques A. P., Mano J. F. e col. (2015b) Influence of freezing temperature and deacetylation degree on the performance of freeze-dried chitosan scaffolds towards cartilage tissue engineering. *Submetido*.
- Rial-Hermida M. I., Oliveira N. M., Concheiro A., Álvarez-Lorenzo C., Mano J. F. (2014) Bioinspired superamphiphobic surfaces as a tool for polymer- and solvent-independent preparation of drug-loaded spherical particles. *Acta Biomaterialia*, 10: 4314-4322.

- Rinaudo M. (2006) Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31: 603-632.
- Rinaudo M., Pavlov G., Desbrières J. (1999) Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40: 7029-7032.
- Rocha H. A., Moraes F. A., Trindade E. S., Franco C. R., Torquato R. J. e col. (2005) Structural and hemostatic activities of a sulfated galactofucan from the brown alga *Spatoglossum schroederi*. An ideal antithrombotic agent? *Journal of Biological Chemistry*, 280: 41278-41288.
- Rodríguez-Jasso R. M., Mussatto S. I., Pastrana L., Aguilar C. N., Teixeira J. A. (2011) Microwave-assisted extraction of sulfated polysaccharides (fucoïdan) from brown seaweed. *Carbohydrate Polymers*, 86: 1137-1144.
- Santo V. E., Gomes M. E., Mano J. F., Reis R. L. (2012) Chitosan-chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6: s47-s59.
- Santos T. C., Höring B., Reise K., Marques A. P., Silva S. S. e col. (2013) In Vivo performance of chitosan/soy-based membranes as wound-dressing devices for acute skin wounds. *Tissue Engineering Part A*, 19: 860-869.
- Sarkar S. D., Farrugia B. L., Dargaville T. R., Dhara S. (2013) Chitosan-collagen scaffolds with nano/microfibrous architecture for skin tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101: 3482-3492.
- Sezer A. D., Cevher E. (2011) Fucoïdan: a versatile biopolymer for biomedical applications. Em: *Active implants and scaffolds for tissue regeneration*. Zilberman M. (ed.) Springer, Berlin Heidelberg, Alemanha. 377-406 p.
- Sezer A. D., Hatipoglu F., Cevher E., Ogurtan Z., Bas A. L. e col. (2007) Chitosan film containing fucoïdan as a wound dressing for dermal burn healing: preparation and in vitro/in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*, 8: article 39.
- Shibata H., Kimura-Takagi I., Nagaoka M., Hashimoto S., Aiyama R. e col. (2000) Properties of fucoïdan from *Cladosiphon okamuranus tokida* in gastric mucosal protection. *Biofactors*, 11: 235-245.
- Shilpi G., Nissreen A. G. (2011) Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science & Technology*, 22: 315-326.
- Signini R., Campana-Filho S. P. (1998) Purificação e caracterização de quitosana comercial. *Polímeros*, 8: 63-68.
- Silva T. H., Alves A., Popa E. G., Reys L. L., Gomes M. E. e col. (2012a) Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatter*, 2: 278-289.
- Silva S. S., Caridade S. G., Mano J. F., Reis R. L. (2013a) Effect of crosslinking in chitosan/aloe vera-based membranes for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, 98: 581-588.
- Silva J. M., Caridade S. G., Oliveira N. M., Reis R. L., Mano J. F. (2015) Chitosan-alginate multilayered films with gradients of physicochemical cues. *Journal of Materials Chemistry B*, 3: 4555-4568.

- Silva J. M., Georgi N., Costa R., Sher P., Reis R. L. e col. (2013b) Nanostructured 3D constructs based on chitosan and chondroitin sulphate multilayers for cartilage tissue engineering. *PLoS ONE*, 8: e55451.
- Silva S. S., Goodfellow B. J., Benesch J., Rocha J., Mano J. F. e col. (2007) Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes. *Carbohydrate Polymers*, 70: 25-31.
- Silva S. S., Luna S. M., Gomes M. E., Benesch J., Pashkuleva I. e col. (2008a) Plasma surface modification of chitosan membranes: characterization and preliminary cell response studies. *Macromolecular Bioscience*, 8: 568-576.
- Silva S. S., Mano J. F., Reis R. L. (2010) Potential applications of natural origin polymer-based systems in soft tissue regeneration. *Critical Reviews in Biotechnology*, 30: 200-221.
- Silva S. S., Motta A., Rodrigues M. T., Pinheiro A. F. M., Gomes M. E. e col. (2008b) Novel genipin-cross-linked chitosan/silk fibroin sponges for cartilage engineering strategies. *Biomacromolecules*, 9: 2764-2774.
- Silva S. S., Oliveira J. M., Benesch J., Caridade S. G., Mano J. F. e col. (2013c) Hybrid biodegradable membranes of silane-treated chitosan/soy protein for biomedical applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 28: 385-397.
- Silva S. S., Oliveira J. M., Mano J. F., Reis R. L. (2006) Physicochemical characterization of novel chitosan-soy protein/TEOS porous hybrids for tissue engineering applications. *Materials Science Forum*, 514-516: 1000-1004.
- Silva S. S., Popa E. G., Gomes M. E., Cerqueira M., Marques A. P. e col. (2013d) An investigation of the potential application of chitosan/aloe-based membranes for regenerative medicine. *Acta Biomaterialia*, 9: 6790-6797.
- Silva S. S., Santos T. C., Cerqueira M. T., Marques A. P., Reys L. L. e col. (2012b) The use of ionic liquids in the processing of chitosan/silk hydrogels for biomedical applications. *Green Chemistry*, 14: 1463-1470.
- Silva S. S., Santos M. I., Coutinho O. P., Mano J. F., Reis R. L. (2005) Physical properties and biocompatibility of chitosan/soy blended membranes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16: 575-579.
- Suh J. K. F., Matthew H. W. T. (2000) Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21: 2589-2598.
- Tang C., Guan Y. X., Yao S. J., Zhu Z. Q. (2014) Preparation of ibuprofen-loaded chitosan films for oral mucosal drug delivery using supercritical solution impregnation. *International Journal of Pharmaceutics*, 473: 434-441.
- Tseng H. J., Tsou T. L., Wang H. J., Hsu S. H. (2013) Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 7: 20-31.
- Upadhyaya L., Singh J., Agarwal V., Tewari R. P. (2014) The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *Journal of Controlled Release*, 186: 54-87.

- Vinoth-Kumar T., Lakshmanasenthil S., Geetharamani D., Marudhupandi T., Suja G. e col. (2015) Fucoïdan – A α -d-glucosidase inhibitor from *Sargassum wightii* with relevance to type 2 diabetes mellitus therapy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72: 1044-1047.
- Wang H., Fu Z. M., Han C. C. (2014) The potential applications of marine bioactives against diabetes and obesity. *American Journal of Marine Science*, 2: 1-8.
- Wang X., You C., Hu X., Zheng Y., Li Q. e col. (2013) The roles of knitted mesh-reinforced collagen–chitosan hybrid scaffold in the one-step repair of full-thickness skin defects in rats. *Acta Biomaterialia*, 9: 7822-7832.
- Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S. K. (2011) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84: 14-21.
- Wijesinghe W., Jeon Y. (2012) Exploiting biological activities of brown seaweed *Ecklonia cava* for potential industrial applications: a review. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 63: 225-235.
- Yilgor P., Tuzlakoglu K., Reis R. L., Hasirci N., Hasirci V. (2009) Incorporation of a sequential BMP-2/BMP-7 delivery system into chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 30: 3551-3559.
- Younes I., Hajji S., Frachet V., Rinaudo M., Jellouli K. e col. (2014) Chitin extraction from shrimp shell using enzymatic treatment. Antitumor, antioxidant and antimicrobial activities of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 69: 489-498.



Hidroxiapatita de origen marino obtenida a partir de espinas de pescado

Mohamed Boutinguiza^{1*}, Rafael Comesaña², Antonio Riveiro¹, Fernando Lusquiños¹, Juan Pou¹

¹ Departamento de Física Aplicada. E.E.I. Campus Lagoas-Marcosende, Universidad de Vigo, 36310, España.

² Departamento de Ingeniería de Materiales, Mecánica Aplicada y Construcción. E.E.I. Campus Lagoas-Marcosende, Universidad de Vigo, 36310, España.

*mohamed@uvigo.es

Resumen

En este trabajo se resumen los resultados de estudios orientados a obtener productos de alto valor añadido a partir de espinas de pescado, que se obtienen como subproducto de la pesca. Para ello, espinas de diversas especies se sometieron a tratamientos térmicos a distintas temperaturas, para obtener la parte mineral correspondiente y analizar su composición y posible aplicación. Los productos obtenidos a 600 °C se componen fundamentalmente de hidroxiapatita (HA) carbonatada tipo B o biológica. Cuando la temperatura de calcinación se eleva hasta los 950 °C parte de la HA se transforma en fosfato tricálcico (β -TCP), dando lugar a un compuesto bifásico de mucha aplicación en reparación de defectos óseos. Los ensayos de citotoxicidad in vitro de los productos obtenidos revelaron que no son tóxicos. Los resultados del estudio evidencian que las espinas de pescado se pueden utilizar como una fuente barata de HA biogénica.

1. Introducción

La pesca de captura y la acuicultura suministraron al mundo alrededor de 148 millones de toneladas de pescado en el año 2010, de los cuales 128 millones de toneladas se destinaron al consumo humano. Los

datos preliminares para el año 2011 elevan esa cifra a 154 millones de toneladas, de las cuales 131 millones de toneladas se han destinado a consumo humano (FAO, 2012). Aunque en los últimos decenios se ha avanzado en el aprovechamiento y uso de los subproductos de la pesca, el porcentaje de captura descartada sobre la captura total sigue siendo elevado, en torno a un 8%; y por otra parte el aprovechamiento de los subproductos de pesca, en su mayoría se orienta hacia el procesamiento de productos de bajo valor añadido.

Existen líneas de investigación incipientes encaminadas a la gestión y aprovechamiento de los residuos procedentes de la actividad de pesca y de marisqueo con una doble vertiente, por un lado solucionar en cierta medida el problema de los residuos y, por otro, imprimir un valor añadido a los subproductos que se aprovechan para aplicaciones novedosas. Intensificar la investigación en el aprovechamiento de los residuos procedentes de la actividad pesquera supondría la reducción de residuos orgánicos, así como aliviar la presión sobre los recursos marinos al obtener de ellos un mayor rendimiento; lo que implica además nuevas vías de industrialización y de creación de empleo. Serían en definitiva, líneas encaminadas a reducir el impacto ambiental de la actividad pesquera y generar productos de alto valor añadido como aplicaciones en el campo de la biomedicina, la farmacia, o la cosmética, etc. En la industria procesadora de pescado muchas especies se comercializan descabezadas y fileteadas, desechando el uso de la parte ósea del pescado que se compone fundamentalmente de fosfato cálcico.

La hidroxiapatita (HA), al igual que otros fosfatos cálcicos, ha sido profusamente utilizada en diversas aplicaciones médicas, como recubrimientos de implantes o relleno de defectos óseos, gracias a que presenta una composición química similar a la parte mineral del hueso humano, lo que la hace compatible con los tejidos vivos. La HA estequiométrica, con la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ y una relación molar de $\text{Ca}/\text{P}=1.67$, es el material que más se asemeja a la parte mineral de los huesos y los dientes. La HA, tanto densa como porosa, se ha venido utilizando en aplicaciones ortopédicas y dentales con excelentes resultados de biocompatibilidad, osteoconductividad y osteoinductividad (Suchanek y Yoshimura, 1998, Hench, 1991, Best y col., 2008). Sin embargo, existen diferencias esenciales entre la HA sintética y la HA natural, ya que esta

última presenta mejor actividad metabólica y mejor respuesta dinámica al medio que la sintética (Best y col., 2008, Kim y col., 2000). La solubilidad y la bioactividad de la HA están estrechamente relacionados con la estructura cristalográfica de la misma, así como con la relación molar Ca/P que presenta; así, cuanto menor es la relación Ca/P, más elevada es la acidez y solubilidad de la HA en cuestión. Para relaciones Ca/P próximas a la unidad, tanto acidez como solubilidad son bastante elevadas, pero disminuyen mucho conforme la relación Ca/P se aproxima a la de la HA estequiométrica (1'67). A diferencia de la sintética, la HA biológica presenta nanoestructuras desordenadas y una composición no estequiométrica, además de un menor contenido de hidroxilos, cuyo contenido en el hueso cortical es alrededor de un 20% inferior al contenido de dehidroxilos en la HA sintética (Leventouri, 2006). En definitiva, la HA natural o biogénica suele diferenciarse de la sintética por su morfología, tamaño y el modo en que se ordena dentro del sistema biológico. Teniendo en cuenta que los materiales a escala nanométrica presentan propiedades químicas y físicas distintas a las del material masivo (Dorozhkin, 2010), cabe esperar que la HA biogénica presente mejores resultados en aplicaciones médicas como su aplicación en relleno de defectos óseos, implantes o recubrimientos, debido a que preserva las propiedades antes mencionadas.

En los últimos años se han redoblado los esfuerzos por parte de los investigadores para desarrollar HA sintética con propiedades similares a su correspondiente biológica. Existe una amplia variedad de técnicas y métodos para la síntesis de HA, tales como el método de la reacción en estado sólido (Rhee, 2002), el método de co-precipitación (Siddharthan y col., 2005), el método sol-gel (Vijayalakshmi y col., 2006), proceso hidrotermal (Ito y col., 1996), etc. La mayoría de estos métodos suelen ser procesos complejos y largos, además de costosos. La HA natural obtenida a partir de huesos de animales tiene la ventaja de preservar algunas de las propiedades inherentes al material precursor como su estructura o composición (Herliansyah y col., 2009). Las espinas de pescado, especialmente las obtenidas de especies que se comercializan fileteadas y descabezadas, pueden suponer una fuente barata de HA natural que contribuiría a una mejor revalorización de los subproductos de pesca al obtener del mismo un producto de alto valor añadido. En el presente capítulo se abordan los resultados de trabajos llevados a cabo parcialmente en el marco de los proyectos europeos INTERREG III A (SP1.P151/03) y

POCTEP (0330_IBEROMARE_1_P) para obtener fosfatos cálcicos a partir de espinas de pescado mediante el proceso de calcinación, así como la caracterización de los mismos para validar su uso como material bioactivo.

2. Materiales y Métodos

2.1 Espinas de pescado

Aunque el estudio ha abarcado un abanico amplio de especies de peces grandes y pequeños para estudiar sus espinas como fuente de fosfato cálcico, aquí nos referiremos solamente a aquellas variedades que puedan suponer una fuente de fosfato cálcico abundante, de fácil procesamiento y barata, como atún (*Thunnus thynnus*), bacalao (*Gadus morhua*), bonito (*Sarda sarda*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), merluza (*Merluccius merluccius*), Palometa (*Trachynotus ovatus*), pez espada (*Xiphias gladius*) y tintorera (*Prionace glauca*). Las espinas se sometieron a congelación inmediatamente después de separarlas de los especímenes para mantener la cadena de frío en todo momento. Posteriormente fueron sometidas a un proceso de cocción en agua hirviendo durante una hora, para luego someterlas a un chorro de agua para retirar los restos de la materia carnosa adherida. Luego se secaron con aire a temperatura ambiente durante 24 horas. Una vez secadas, las espinas de cada especie se sometieron a un proceso de calcinación en mufla a dos temperaturas distintas de 600° y 950° C, con una rampa de calentamiento de 10°C/minuto y en presencia de aire. Una vez alcanzada la temperatura de calcinación se mantienen isotérmicamente durante 12 horas para luego enfriarlas a 20°C/minuto. Las espinas de cada especie han sido pesadas antes y después de la calcinación, para estimar la pérdida de masa orgánica en el proceso. Finalmente las espinas se molieron con la ayuda de un molino de bolas cerámicas para analizar el polvo obtenido.

2.2 Caracterización

Para analizar la morfología y la composición del material obtenido se ha utilizado un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo, FSEM (JEOL-JSM-6700F) dotado de un detector EDAX PV 9760 para dispersión de energía de Rayos X (EDX). Para un estudio más detallado de la

morfología y la microestructura se ha utilizado un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (JEOL-JEM 210 FEG), equipado con una cámara digital de alta resolución y voltaje de aceleración de 200 kV. En los cristales muy delgados se han obtenido imágenes de microscopía electrónica de alta resolución (HRTEM) para determinar las fases cristalinas de los mismos.

Para determinar la estructura cristalina de los polvos, así como su composición se ha empleado un difractor de rayos X (XRD) SIEMENS D-5000. Se han obtenido datos en el rango 2θ de 5° a 40° y la identificación de las fases se ha llevado a cabo comparando los patrones de difracción recopilados con los patrones estándar ICDD (JCPDS).

Para hacer una estimación de la proporción del contenido de fosfato tricálcico (β -TCP) presente en los polvos obtenidos, se ha utilizado una mezcla de HA y β -TCP (Plasma-Biotal, Reino Unido) con diferentes proporciones en peso y se analizaron con XRD siguiendo lo establecido por la norma ISO-13779:3. A partir de una curva de calibración de la relación de la intensidad de los picos 211 de la HA y el 0210 del β -TCP se extrapola la proporción en peso entre la HA y el β -TCP en los productos obtenidos en función de la intensidad de los mismos picos (ISO 13779-3, 2008).

La identificación de los grupos funcionales a diferentes temperaturas se ha llevado a cabo mediante espectroscopía infrarroja de Fourier (FTIR) usando un espectrómetro ThermoNicolet 6700. Los espectros se han obtenido en un rango entre 400 y 4.000 cm^{-1} y una resolución de 4 cm^{-1} .

Los espectros de espectroscopía Raman se han obtenido con un espectrómetro Horiba Jobin Yvon LAbRam-HR800 provisto de una fuente de excitación láser de Ar (488 nm) y acoplado a un microscopio. Los espectros Raman se han obtenido entre 350 and 1.800 cm^{-1} con una resolución de 1 cm^{-1} .

Para estimar la relación Ca/P de los polvos obtenidos, así como su composición y el contenido de metales pesados presentes en los mismos, se ha empleado la espectrometría de emisión óptica por plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) usando un espectrómetro Perkin Elmer Optima 4300 DV.

2.3 Cultivo celular

Células de osteoblastos de ratón de la línea celular MC3T3-E1 obtenidas de la Colección Europea de Cultivos Celulares (Salisbury, Reino Unido) fueron cultivadas en medio alfa mínimo esencial (α -MEM) con nucleótidos y glutamina (Lonza); y suplementados con 10% de suero fetal bovino (Lonza). Las células fueron incubadas a 37° C en una atmósfera de medio húmedo con 5% de CO₂.

2.4 Test de citotoxicidad in vitro

Para evaluar la citotoxicidad de la HA natural obtenida a partir de espinas de pescado y compararla con la HA comercial, se han preparado muestras correspondientes a los polvos de espina de pescado obtenidos a temperaturas de 600 ° y 950° C y muestras de de HA comercial de Sigma-Aldrich, HA289396. Se han preparado extractos de las muestras después de introducir las muestras en forma de polvo en un mezclador rotatorio con medio alfa mínimo esencial (α -MEM) a 37° C durante 24 horas, siguiendo el procedimiento de la norma ISO 10993-12. La proporción de masa frente a volumen de los extractos ha sido de 0.1 g a 2 ml. Después de filtrar los materiales y el medio, los extractos se diluyeron en alfa metiltiazoliltetrazolio (MTT) en porcentajes de 100, 50, 20, 10 y 5% de la concentración original. Los extractos se usaron para cultivar células en 96 pocillos, con una concentración de ml⁻¹ durante 24 horas. Después del periodo de incubación se les añadió el reactivo de MTT [bromuro de 3-(4,5-dimethylthiazol-2)-2,5-diphenyltetrazol]. La enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa reduce el MTT a formazán, dando un color púrpura, permitiendo así determinar la actividad mitocondrial de las células tratadas. Como control negativo se usó el mismo cultivo de células alfa MEM y como control positivo tóxico se empleó una solución de fenol con una concentración de 6.4 g l⁻¹.

3. Resultados

Para hacer una estimación del porcentaje de la parte mineral en el esqueleto de las especies estudiadas, se ha medido la masa antes y después del proceso de calcinación. Como era de esperar, las especies pequeñas en general, junto con las especies con esqueletos cartilagosos como

tintorera o el bacalao, presentan una pérdida de masa elevada, alrededor del 70%. Por el contrario, las especies grandes presentan en general una pérdida de masa inferior. Además el procedimiento de obtención de las espinas de estas últimas es mucho más sencillo que en el caso de las especies pequeñas, lo que puede incidir en abaratar el coste del producto final. La tabla I ilustra la pérdida de masa de espinas en el proceso de calcinación de algunas de las especies estudiadas.

Tabla I. Pérdida de masa de esqueletos de algunas especies en el proceso de calcinación a 600 °C.

Especie	Palo-meta	Grana-dero	Bacalao	Tinto-rera	Lubina	Merluza	Pez espada	Atún
Pérdida de masa (%)	81	68	70	75	59	43	58	60

En cuanto a los análisis de los polvos obtenidos después de los procesos de calcinación, los análisis llevados a cabo con FSEM y TEM, revelan que están compuestos por partículas con forma alargada similar a prismas de tamaño submicrométrico, sin que exista una diferencia morfológica apreciable entre las distintas especies analizadas ni entre la misma especie tratada a las temperaturas mencionadas. El aspecto de las partículas es el que se puede apreciar en la Figura 1, que muestra imágenes FSEM de partículas obtenidas de varias especies distintas calcinadas a diferentes temperaturas. En lo que respecta a la cristalinidad del producto obtenido, los análisis llevados a cabo en todos los productos obtenidos de las especies analizadas muestran que son cristalinos. La Figura 2A muestra una imagen de HRTEM en la que claramente se aprecia su carácter cristalino, exhibiendo patrones regulares con distancias interplanares de 0'80 nm; la correspondiente transformada rápida de Fourier (FFT) ilustrada en miniatura, muestra una serie de puntos claros de ordenación aperiódica, lo que indica que no se trata de un monocristal. La Figura 2B (Boutinguiza y col., 2012) muestra las reflexiones (0-10) y (-211) a lo largo del eje de zona [102] correspondientes a las distancias interplanares de 0'80 y 0'38 nm. Estas distancias son muy próximas a las distancias entre planos cristalinos de la HA (0'82 y 0'39 nm respectivamente). Para ampliar el análisis del producto obtenido, se ha llevado a cabo un estudio de la composición elemental de la parte mineral de los esqueletos de diversas

especies para estimar, tanto la relación molar Ca/P, como la presencia de metales pesados.

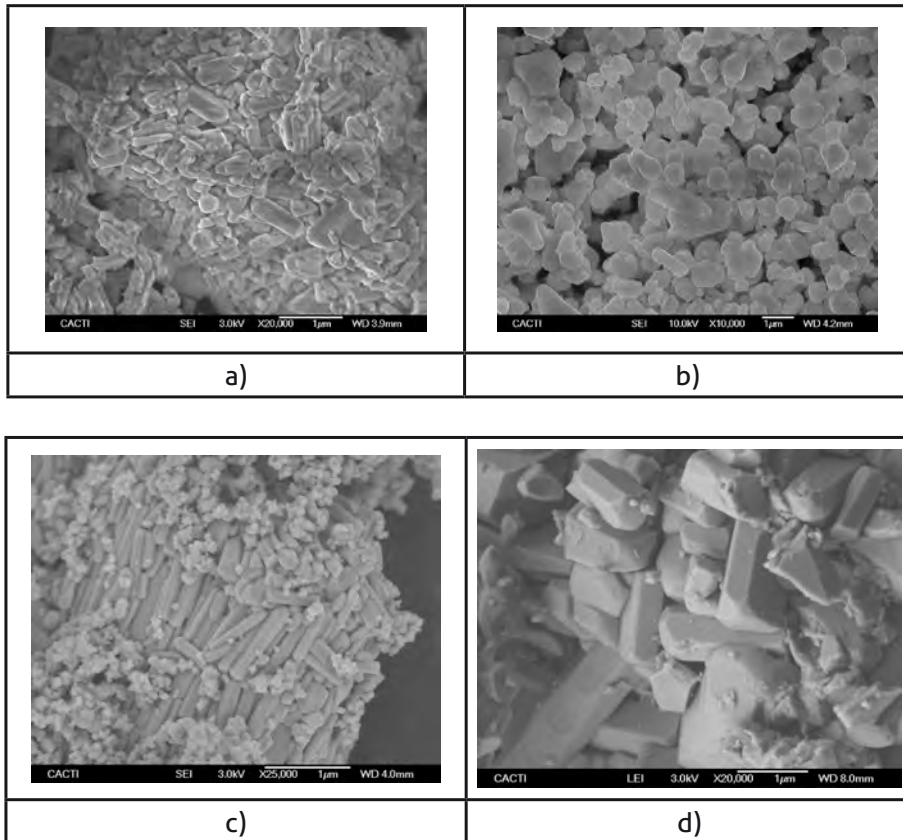


Figura 1. Aspecto de las partículas de la parte mineral de espinas de pescado después de la calcinación: a) Pez espada (*Xiphias gladius*) a 600 °C, b) Bacalao (*Gadus morhua*) a 600 °C, c) Tintorera (*Prionace glauca*) a 600 °C, d) Tintorera (*Prionace glauca*) a 950 °C. Figura 2. a) Imagen de microscopía de transmisión de alta resolución (HRTEM) del lado de una partícula individual con su correspondiente FTT indicando "spots" aperiódicos (con flechas). b) En la FFT de la imagen a) las reflexiones (0-10) y (-211) a lo largo de la dirección de eje [102] correspondiente a la HA (Boutinguiza y col., 2012).

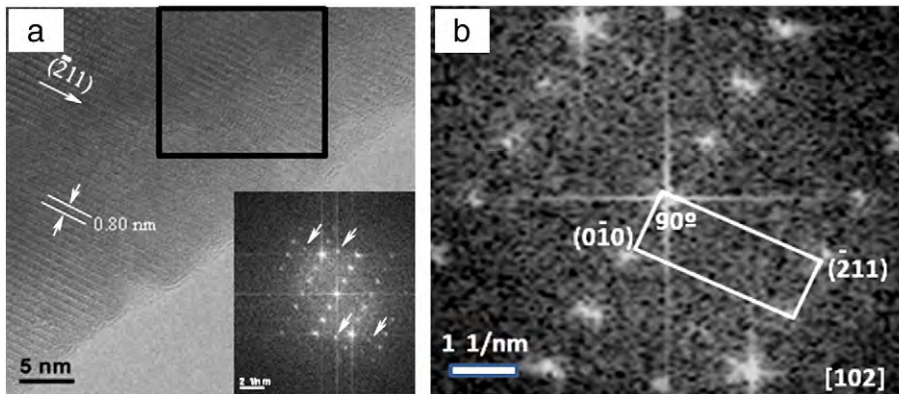


Figura 2. a) Imagen de microscopía de transmisión de alta resolución (HRTEM) del lado de una partícula individual con su correspondiente FFT indicando "spots" aperiódicos (con flechas). b) En la FFT de la imagen a) las reflexiones (0-10) y (-211) a lo largo de la dirección de eje [102] correspondiente a la HA (Boutinguiza y col., 2012).

La tabla II muestra que todas las muestras se componen fundamentalmente de Ca y P, con una relación molar de aproximadamente $1'87 \pm 0'02$, superior a la relación de la HA estequiométrica. En mucho menor porcentaje están otros elementos como el estroncio, sodio, magnesio o el potasio. El contenido en metales pesados es prácticamente despreciable en las de las especies estudiadas.

Tabla II. Composición elemental de la parte mineral de esqueletos de algunas de las especies estudiadas medida por ICP-OES (% en peso) después de calcinación a 600 °C.

Muestra	Al	Ca	Fe	K	Mg	Na	P	Sr
Palometa	0'001	7'338	0'003	0'050	0'218	0'221	3'310	0'168
Granadero	0'002	12'832	0'001	0'017	0'298	0'248	5'304	0'270
Tintorera	0'001	10'339	0'001	0'029	0'124	0'348	4'037	0'309
Lubina	0'004	16'842	0'006	0'066	0'269	0'376	6'555	0'333
Merluza	0'002	21'560	0'001	0'502	0'479	0'586	10'051	0'351
Pez espada	0'002	17'607	0'001	0'022	0'195	0'321	6'787	0'427
Atún	0'002	34'760	0'002	0'037	0'510	0'715	16'632	0'128

Como los resultados de la caracterización de las especies abordadas son similares, aquí se hará hincapié en dos especies representativas, especialmente en los patrones de XRED, FTIR, RAMAN, así como para los ensayos MMT. Designaremos las muestras procedentes de pez espadas con "Xiph" y las procedentes de atún "Thun".

Para identificar los grupos funcionales presentes en la parte mineral de las especies estudiadas, en este capítulo se muestran los espectros FTIR y RAMAN correspondientes a las muestras de pez espada y atún tratadas a temperaturas distintas, que se muestran en las Figuras 3 y 4. Los patrones FTIR de las muestras presentan picos estrechos, lo que sugiere alto grado de cristalinidad, además de las bandas características de los grupos fosfato (PO_4^{3-}) en tres regiones distintas; la primera viene dada por los picos 1093 , 1047 cm^{-1} , correspondientes al modo de tensión ν_3 , y el pico 962 cm^{-1} , correspondiente al modo de tensión ν_1 . La segunda región de los iones fosfato está representada por picos bien definidos en 634 , 603 y 571 cm^{-1} , y corresponde a la banda ν_4 de vibración de flexión. La tercera región se aprecia con poca intensidad en el pico 474 cm^{-1} , y corresponde a la banda ν_2 de modo de flexión. El modo de vibración de tensión correspondiente a los iones hidroxilo (OH^-) está presente en todas las muestras en el pico 3573 cm^{-1} con una intensidad muy débil. En lo que respecta a los iones carbonato (CO_3^{2-}) presentes en el hueso y en la HA carbonatada existen normalmente tres modos de vibración que se pueden detectar con FTIR, sin embargo la banda ν_4 suele ser muy débil y por tanto, muy difícil de detectar (Nelson y col., 1982, Rehman y col., 1994). En las muestras calcinadas a $600 \text{ }^\circ\text{C}$, los iones carbonato se han detectado en dos regiones distintas, en el pico de 875 cm^{-1} y en la zona comprendida entre los picos 1639 y 1384 cm^{-1} .

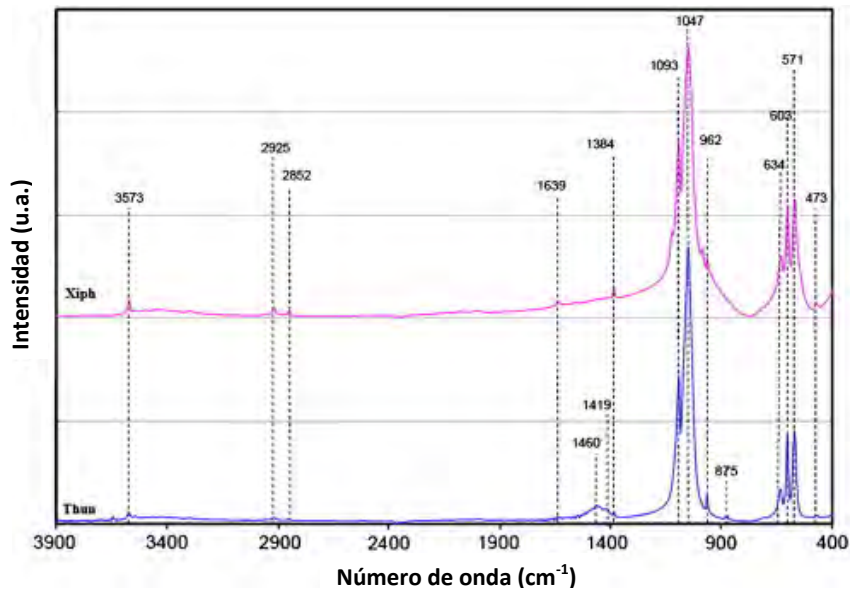


Figura 3. Espectro FTIR de la HA obtenida a partir de espinas de pez espada y atún a 600 °C (Boutinguiza y col., 2012).

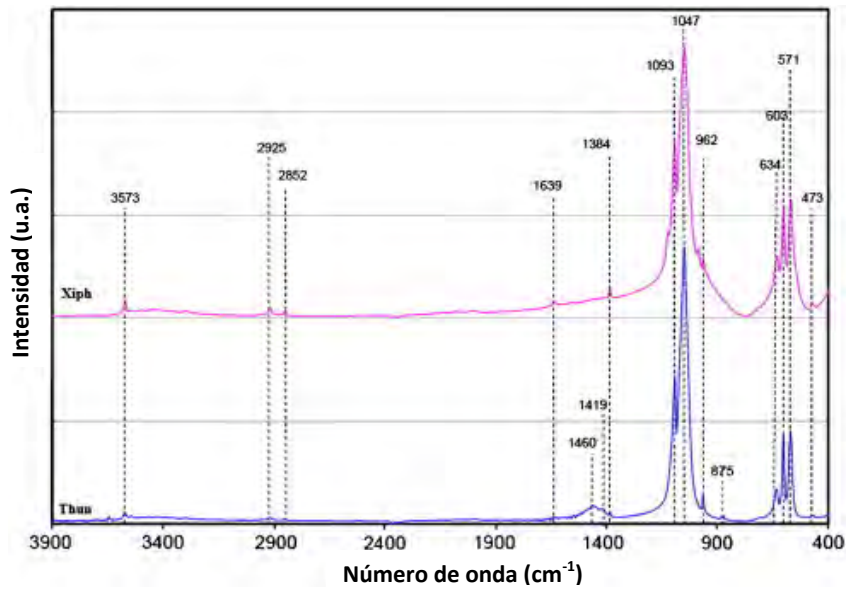


Figura 4. Espectro FTIR de la HA obtenida a partir de espinas de pez espada y atún a 950 °C (Boutinguiza y col., 2012).

En las Figuras 5 y 6 se representan los espectros RAMAN de las muestras calcinadas a 600 y 950 °C, donde se puede observar la presencia de un pico de mucha intensidad en 962 cm^{-1} , que corresponde a la banda ν_1 de vibración de tensión de los iones fosfato. Picos de intensidad media se localizan en 430 y 447 cm^{-1} correspondientes a las bandas ν_2 de flexión de los iones PO_4^{3-} , mientras que las bandas de flexión ν_4 se localizan en 579, 591, 607 cm^{-1} , y con menor intensidad en 615 cm^{-1} . En el rango de los 1000 y 1100 cm^{-1} , los picos de intensidad media localizados en 1029, 1047 y 1076 cm^{-1} se pueden asignar a la banda ν_3 de tensión asimétrica de los iones PO_4^{3-} , que se solapan con la contribución de la banda ν_1 de tensión asimétrica de los iones CO_3^{2-} , localizable en el pico de 1073 cm^{-1} (Movasaghi y col., 2007, Penel y col., 1998). El patrón RAMAN del material procedente del esqueleto de pez espada (Xiph) calcinado a 950 °C comparte picos con la HA, pero presenta también picos que no están en el patrón de la HA, como son los picos localizados en 409, 974 y 1015 cm^{-1} , y que corresponden respectivamente a las bandas ν_2 , ν_1 y ν_3 del fosfato tricálcico β ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: β -TCP) (Li y col., 2004).

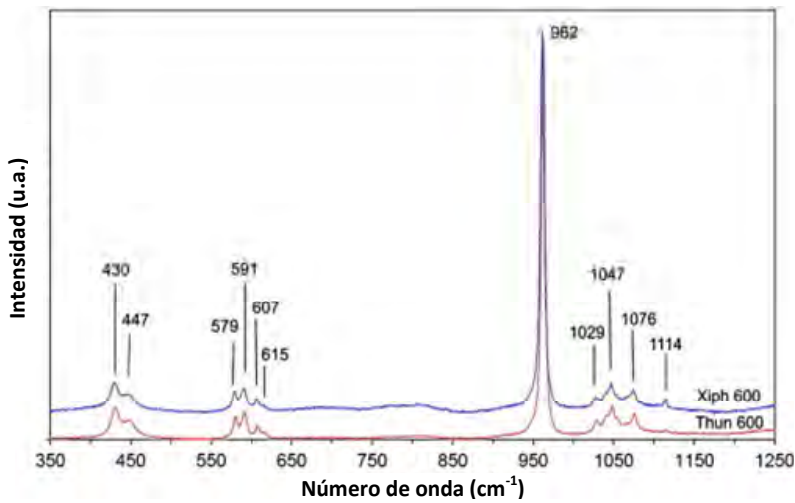


Figura 5. Espectro RAMAN de la HA obtenida a partir de espinas de pez espada y atún a 600 °C (Boutinguiza y col., 2012).

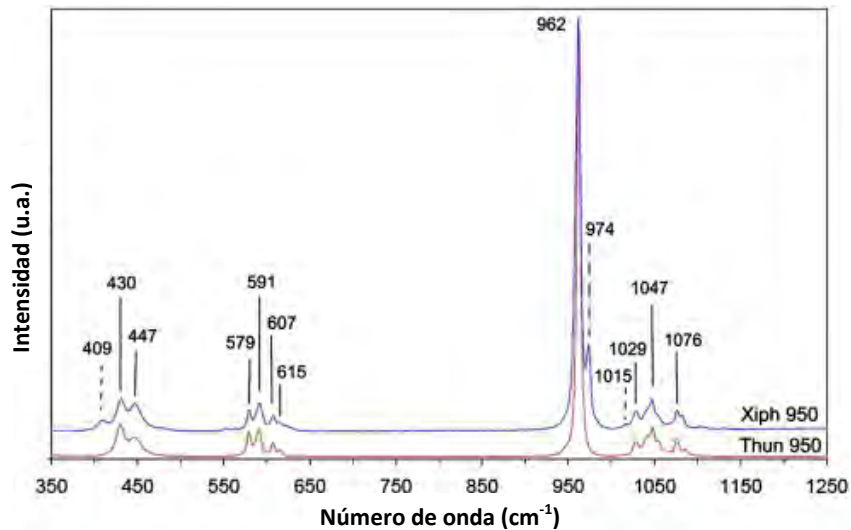


Figura 6. Espectro RAMAN de la HA obtenida a partir de espinas de pez espada y atún a 950 °C (Boutinguiza y col., 2012).

La Figura 7 muestra los patrones de difracción de rayos X (XRD) de las dos muestras calcinadas a 600 °C que se han escogido para comparar con el patrón de la HA comercial. Como se puede observar, los productos obtenidos coinciden con el patrón de la HA comercial, sin que haya diferencia entre las especies comparadas. El resultado cambia cuando las muestras se calcinan a una temperatura de 950 °C, tal y como se puede observar en la Figura 8. Aunque las mayores reflexiones coinciden con las de la HA comercial, se observa la presencia de picos que corresponden al fosfato tricálcico β , que sugieren la presencia de un pequeño porcentaje de este compuesto en el producto final. Una estimación del porcentaje de fosfato cálcico presente en la muestra Xiph y realizada siguiendo las indicaciones de la norma ISO-13779:3, revela que aproximadamente el 13% es fosfato tricálcico. En las principales reflexiones de los picos de difracción se aprecia un ligero desplazamiento de los picos hacia mayores ángulos si se toma como referencia los patrones de difracción de la HA comercial, lo que sugiere cambios en la celda unidad de la HA debido a sustituciones de elementos en la celda. Los cálculos de la relación c/a de la celda permiten estimar el contenido de carbonato presente en la HA tipo B o HA biológica, a partir de los patrones de XRD (LeGeros, 1991). Este

método empírico relaciona la proporción del parámetro de celda c/a con el coeficiente estequiométrico x :

$$x = 6(30'383c/a - 22'208)^{3/4}$$

que permite estimar el contenido de carbonato en la HA tipo B o biológica, si se asume que su fórmula química es:

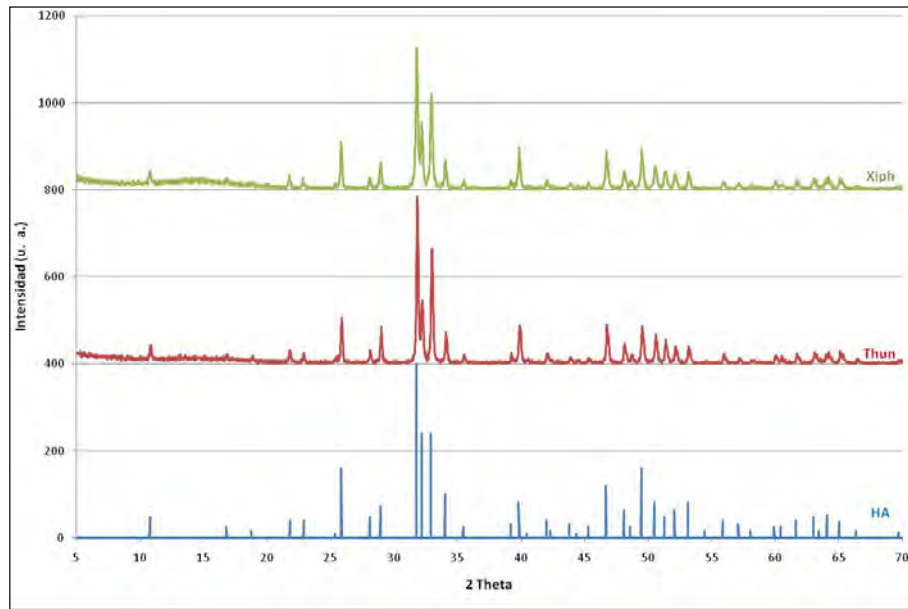
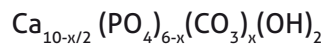


Figura 7. Patrón de XRD de la HA obtenida a partir de espinas de pez espada y atún a 600 °C comparada con HA comercial (Boutinguiza y col., 2012).

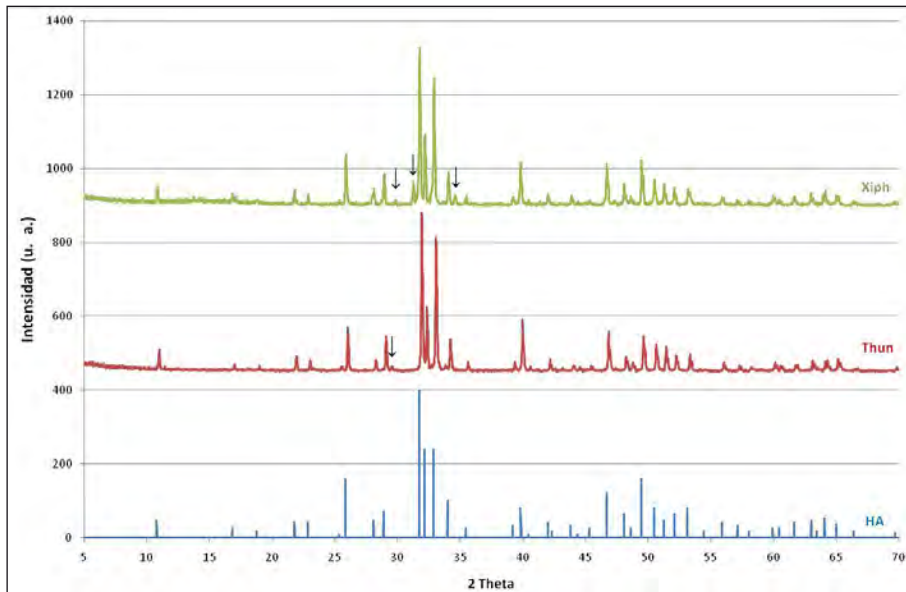


Figura 8. Patrón de XRD de la HA obtenida a partir de espinas de pez espada y atún a 950 °C comparada con HA comercial (↓indica picos de β -TCP) (Boutinguiza y col., 2012).

Comparando los parámetros de red cristalina de la HA obtenida a partir de espinas de pescado, hemos podido calcular que el parámetro a en el caso de la HA obtenida a partir de espinas de atún calcinadas a 600 °C y 950 °C se reduce a 9'397 y 9'377 nm respectivamente respecto a la HA estequiométrica (9'418 nm); mientras el parámetro c para ambas muestras aumenta a 6'891 y 6'863 nm respectivamente respecto al mismo parámetro en la HA estequiométrica (6'884 nm). En el caso de los parámetros de red, la HA obtenida a partir de las espinas de pez espada calcinadas a 600 y 950 °C, el parámetro a es de 9'408 y 9'425 nm respectivamente; sin embargo su parámetro c se incrementa a valores de 6'901 y 6'890 nm.

La relación de los parámetros c/a calculada para las muestras de HA obtenida a partir de atún y pez espada a 600 °C es de 0'7333 y 0'7335, superior a la que se obtiene para la HA estequiométrica (0'7309), lo que permite estimar un contenido de carbonatos del 5'2% en el HA a partir de atún, y un 5'5% en el caso del pez espada. Los mismos cálculos para las mismas muestras pero calcinadas a 950 °C arrojan unas estimaciones

de contenido de carbonatos de 2'5% y 0'6% para el atún y pez espada respectivamente.

Como es conocido, la parte mineral del hueso está compuesta por cristales de tamaño nanométrico. Un método alternativo para estimar los nanocristales de HA obtenidos a partir de espinas de pescado a partir de los patrones de XRD se basa en la ecuación de Scherrer (Patterson, 1939):

$$d = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta}$$

Donde d es el tamaño medio de los cristales en la dirección normal al plano de difracción hkl , β es la anchura total a media altura del pico (en radianes), λ la longitud de onda de la radiación de rayos X (1'5418 Å), y k es la constante de Scherrer que se relaciona con la forma del cristal. Asumiendo que d , k y $\cos\theta$ son constantes para la misma reflexión se ha utilizado el pico de la línea de la reflexión (2 1 1) por ser una línea clara y sin interferencias para calcular el tamaño de cristal de las muestras, arrojando unos valores en torno a 50 y 66 nm para las muestras calcinadas a 600 °C y 950 °C respectivamente. El aumento de tamaño de cristal para las muestras tratadas a mayor temperatura se confirma en una mayor intensidad y menor ancho de los picos de los patrones de difracción de dichas muestras.

La Figura 9 muestra los resultados de los ensayos de citotoxicidad. En el ensayo de MTT, las células después de haber sido incubadas en extractos de muestras de la HA obtenida a partir de espinas producen una cantidad de formazán muy elevada, lo que indica que las muestras no son tóxicas. Ninguna de las muestras de extractos con 100% de concentración ha tenido efecto adverso en la actividad celular.

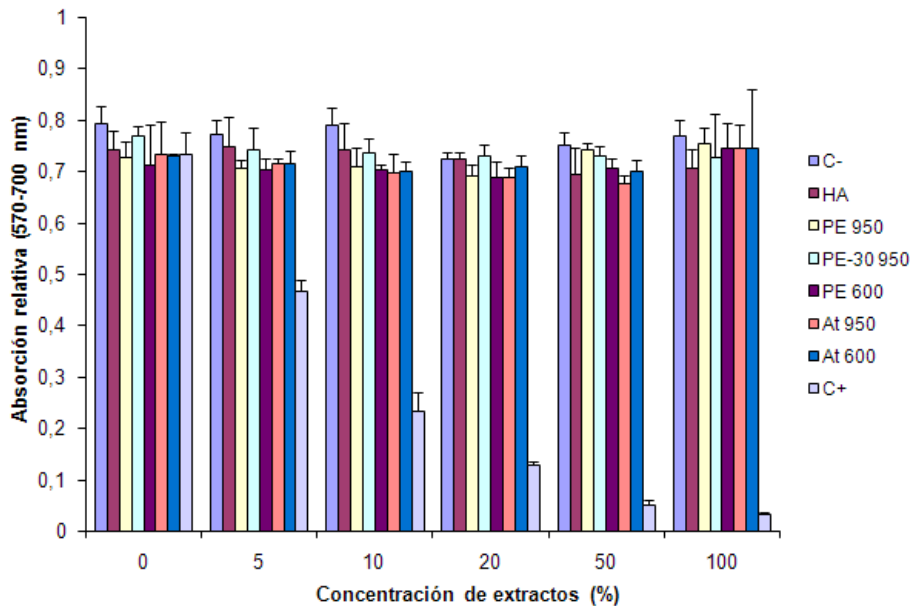


Figura 9. Formación de formazán por la línea celular después de la incubación con HA comercial y extractos de muestras de HA obtenida a partir de pez espada y atún a 600 y 950 °C. C+: Control positivo, C-: Control negativo (Boutinguiza y col., 2012).

4. Discusión

Diversos estudios realizados por diferentes investigadores apuntan a que la HA de origen animal es biológicamente más activa que la HA sintética debido a que conservan algunas de las propiedades originales inherentes a la parte mineral del hueso, como pueden ser la baja cristalinidad, el tamaño nanométrico de sus cristales, así como la presencia de elementos minoritarios en su composición, como el Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , etc. (Ferraz y col., 2004, Linhart y col., 2001). El tamaño y la forma de los cristales tienen una importancia capital en las propiedades biomecánicas de los huesos, pues la orientación preferencial de los cristales de HA en el colágeno determina la resistencia del hueso. Como se puede apreciar en las imágenes de la Figura 1, los cristales obtenidos de espinas de pescado presentan un aspecto alargado, que probablemente se ha formado de la fusión de pequeños bloques. Esta morfología, distinta al aspecto acicular de los cristales de la HA sintética, se puede explicar mediante las sustituciones de CO_3^{2-} por PO_4^{3-} , y Na^+ por Ca^{2+} , que producen cambios de tamaño en el cristal apatita como en la morfología, de acicular a tubular (LeGeros y LeGeros, 1993).

El tamaño y la forma de los cristales de la HA biogénica o natural pueden preservar propiedades importantes, como la bioactividad o la flexibilidad de la estructura (Huang y col., 2007, Chevalier y Gremillard, 2009); sin embargo, se debe controlar la temperatura de calcinación, ya que la recristalización producto de altas temperaturas puede incrementar ligeramente el tamaño de los cristales de los huesos (alrededor de 5-20 nm de ancho por 60 nm de largo) y modificar la arquitectura del tejido original (Paul y Sharma, 2006).

La relación molar Ca/P de los productos obtenidos de las espinas de pescado es superior a la de la HA estequiométrica. Esto se explica por la presencia de iones carbonato sustituyendo a iones fosfato, lo que indica que es una HA tipo B. Este tipo de HA es típico en la parte mineral de las apatitas biológicas, donde los iones carbonato sustituyen a los iones fosfato, contribuyendo a aumentar la relación Ca/P (Antonakos y col., 2007). Este efecto ha sido reportado por otros autores en HA obtenida a partir de hueso vacuno (Joschek y col., 2000). Este aspecto tiene mucha relevancia en la bioactividad del material, ya que no es simplemente la presencia de los iones carbonato la que se asocia a la bioactividad sino su presencia sustituyendo a los iones fosfato, de igual manera que sucede en la parte mineral de los huesos. Investigaciones realizadas con HA tipo A, donde los iones CO_3^{2-} sustituyen a los OH^- , han revelado menos afinidad de las células osteoblásticas del hueso trabecular con la HA tipo A que con la HA estequiométrica, y consecuentemente menos adhesión y producción de colágeno (Redey y col., 1999, Redey y col., 2000). La HA obtenida a partir de espinas de pescado es HA carbonatada tipo B, como muestran los patrones de espectroscopía de infrarrojo FTIR. Aunque el pico de 875 cm^{-1} que se asocia al modo flexión está presente tanto en la HA tipo A como en la tipo B y los picos 1639 y 1384 cm^{-1} se asocian al modo de tensión de los iones carbonato; los picos de 1460 y 1419 cm^{-1} corresponden al modo de flexión de los iones carbonato sustituyendo a los iones fosfato en la HA de tipo B (LeGeros y col., 1978, Mayer y col., 1990). El análisis de los espectros RAMAN también conduce a la misma conclusión, pues la ausencia del pico de 1100 cm^{-1} característico de los carbonatos sustituyendo a los iones hidroxilo, permite descartar la presencia de la HA tipo A. Este resultado se complementa con la elevada relación Ca/P obtenida mediante el análisis elemental con espectroscopía ICP-OES, que confirma la presencia de iones carbonato sustituyendo iones fosfato. Sin embargo, las bandas

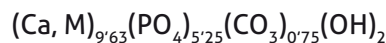
de los iones carbonato en los patrones FTIR disminuyen sensiblemente de intensidad o decrecen para los productos calcinados a 950 °C, probablemente debido a la descomposición de los iones carbonato en dióxido de carbono, que sucede en un rango de temperaturas entre 700 y 1100 °C (Barinov y col., 2006). Este resultado aconseja tratamientos térmicos a temperaturas inferiores para conservar el contenido de iones carbonato en la composición original.

Los productos obtenidos se componen de cristales cuyo tamaño medio, medido a partir del pico de reflexión de XRD (211), está en torno a 50 nm, similar al tamaño de cristal de un hueso adulto (Olszta y col., 2007). Sin embargo, las muestras tratadas a 950 °C se componen de cristales de mayor tamaño, debido a la alta temperatura durante un tiempo prolongado (12 horas). Se han reportado resultados similares para hueso ovino cuando la temperatura de tratamiento se eleva de 400 a 900 °C. Estos resultados confirman por otra vía que la HA tipo B obtenida de espinas calcinadas a 600 °C preserva mejores propiedades que la obtenida a 950 °C.

En lo que respecta a la estructura cristalina de la HA bajo estudio, los elementos que se incorporan al cristal mediante sustituciones tienden a modificar los parámetros de la red cristalina debido a la diferencia de tamaño de los radios iónicos. La presencia de spots aperiódicos en la imagen FFT correspondiente a la imagen de microscopía de alta resolución de la Figura 2, se puede interpretar como defectos en la estructura cristalina debido a la incorporación de iones en la estructura de la HA. El Ca en la estructura hexagonal de la HA posee dos posiciones diferentes. Los cationes de calcio en la posición I (CaI) están coordinados con nueve átomos de oxígeno que pertenecen a seis iones fosfato formando triángulos y forman una estructura columnar. Los cationes calcio en la posición II están coordinados con siete átomos de oxígeno, seis de los cuales pertenecen a iones fosfato y uno al ion hidroxilo. Los átomos CaI están perfectamente alineados en columnas y cualquier cambio en la interacción metal-oxígeno afecta la red entera. Sin embargo, los átomos CaII dispuestos en capas sucesivas están escalonados y permiten desplazamientos locales sin comprometer toda la estructura. Cuando se producen sustituciones de elementos con radios inferiores al del Ca (radio = 0,99 Å) en la HA, se incorporan preferencialmente en la posición del CaI; mientras que los elementos con radios mayores al del Ca se incorporan en la posición del

Call (Li y col., 2007, Boanini y col., 2010). En la HA obtenida a partir de espinas los elementos con radios menores que el Ca, como el Mg (0'66 Å) y el Na (0'96 Å) podrían ocupar la posición Cal; mientras otros con mayor radio, como el Sr (1'13 Å) y el K (1'33 Å) podrían ocupar la posición Call.

Cuando los carbonatos se integran en la estructura cristalina de la HA, los CO_3^{2-} con un volumen inferior al de los PO_4^{3-} que sustituyen, provocan una reducción del parámetro a de la red y un incremento del parámetro c de la red cristalino (Leventouri, 2001). Sin embargo, la diferencia de tamaño en el parámetro a entre la HA comercial y los polvos calcinados a 950 °C es menor que con los obtenidos a 600 °C. Esta diferencia se debe a la descomposición de los carbonatos cuando la temperatura es elevada, si bien parte de los iones carbonato migran de los fosfatos para ocupar los lugares de los hidroxilo, lo que da lugar a un pequeño aumento del parámetro a (Ivanova y col., 2001). Ese resultado concuerda con el contenido de carbonatos en la HA obtenida de espinas calcinadas a 600 °C, sin que haya diferencia entre las especies examinadas, siendo el contenido en las mismas similar al de la parte mineral del hueso (Driessens, 1983). De esta manera, se ha calculado cuantitativamente el resultado observado en los espectros FTIR que indican una reducción de carbonatos cuando la temperatura de calcinación pasa de los 600 a los 950 °C. Dicho resultado corrobora que una temperatura de calcinación alrededor de los 600 °C sería la adecuada para obtener una HA tipo B o biológica, con un contenido en carbonato similar al que tienen las HA biológicas. Este tipo de material tendría la siguiente fórmula química:



donde M representa Mg, Na, K y Sr cuya presencia es habitual en la HA biológica. Estos elementos juegan un papel en el comportamiento de la HA biológica, ya que contribuyen a la adhesión celular y al metabolismo del cuerpo humano. Particularmente al Mg y K se les atribuye un papel especial en el metabolismo del hueso y en la osteoporosis (Šarić y col., 2005, Gibson y Bonfield, 2002). El Mg desempeña un papel crucial en la función y proliferación celular. Las células son incapaces de proliferar en ausencia de Mg extracelular debido a la reducción del ADN, ARN y la síntesis de proteínas (Rude y Gruber, 2004); mientras que el Sr se asocia a reducción en la reabsorción del hueso y al aumento de la formación del hueso, lo que contribuye a limitar el riesgo de fracturas (Marie, 2006).

La presencia de β -TCP en los productos obtenidos demuestra que bajo ciertas condiciones térmicas de calcinación es posible obtener polvos bifásicos, formados por β -TCP e HA biológica, pues parte de la HA se transforma en β -TCP. Resultados similares se han obtenido por otros autores al calcinar esmalte a 700 °C (Shi y col., 2005) y hueso animal a 800 °C (Mkukuma y col., 2004). El fosfato cálcico bifásico, que comprende HA no reabsorbible con β -TCP reabsorbible se considera adecuado para aplicaciones de sustitución de hueso, pues la HA aporta la estructura permanente para la formación del nuevo hueso mediante la osteoconducción, mientras la resorción del β -TCP satura el medio con los iones calcio y fosfato para acelerar la formación del hueso nuevo (Vallet-Regí y González-Calbet, 2004, Goyenvalle y col., 2006). La calcinación a 950 °C supone un aumento de la cristalinidad del producto que se aprecia en el aumento de la intensidad y limitada anchura de los picos del XRD, así como en el del tamaño de los cristales hasta alrededor de los 66 nm.

Teniendo en cuenta la facilidad que presenta la HA para almacenar metales pesados mediante el intercambio iónico o por adsorción de iones pesados en la superficie cristalina (Moriguchi y col., 2008), es importante hacer una estimación del contenido de metales pesados y elementos tóxicos en la parte inorgánica de las espinas de pescado utilizadas como fuente de fosfato cálcico. En las muestras estudiadas, las concentraciones de Pb, Cd y Hg están por debajo del límite que establece la Sociedad Americana para Muestras y Materiales (ASTM) para la parte inorgánica del hueso en cirugías de implantes (ASTM, 1999). La ausencia de contenido significativo de elementos tóxicos en los productos concuerda con los resultados de los resultados de los ensayos celulares de MTT, que muestran que la HA obtenida a partir de espinas no es citotóxica, con resultados similares a los de la HA comercial.

De los resultados del presente estudio, se desprende que las espinas pueden suponer una fuente de HA sostenible, pues se obtendría de un residuo de la pesca para obtener un producto alto valor añadido, a diferencia por ejemplo de la HA de origen coralino que puede amenazar el coral. Por otra parte, de las espinas se obtiene HA biológica con presencia de Mg que sería más beneficioso en aplicaciones de sustituciones óseas que la HA que no contiene Mg, pues el uso de esta HA contribuye a mantener el contenido de magnesio en el nivel adecuado para promover la

proliferación celular, que tiene una importancia capital en la subsanación de defectos óseos (Rude y Gruber, 2004).

5. Conclusiones

En este trabajo se ha obtenido HA a partir de espinas de pescado que están disponibles como residuo de las actividades de la pesca industrial. La HA obtenida es de tipo B, donde los carbonatos sustituyen a los fosfatos, con una relación molar Ca/P superior a la HA estequiométrica. El aumento de la relación de los parámetros de red c/a de la HA obtenida respecto a la de la HA estequiométrica permitió estimar el contenido de carbonatos en los productos obtenidos, que resultó ser del 5% en la HA obtenida a partir de espinas calcinadas a 600 °C, que es similar al contenido de carbonatos en la parte mineral del hueso humano. En las espinas calcinadas a 950 °C disminuyó el contenido de carbonatos por descomposición debido a las altas temperaturas, acompañado de una transformación parcial de la HA en β -TCP. Los ensayos celulares llevados a cabo con HA obtenida a partir de espinas de pescado demostraron que no es citotóxica.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de FANDICOSTA S.A (Moaña, España) y CETMAR que suministraron las espinas, así como la asistencia técnica del personal del CACTI (Universidad de Vigo) y la del Dr. A. de Carlos, del Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología (Universidad de Vigo).

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los proyectos INTERREG III A (SP1.P151/03) y POCTEP (0330_IBEROMARE_1_P) del Programa de la Unión Europea, así como de los proyectos (CICYT/FEDER MAT2006-10481) y (INCITE09E2R303103ES) del Gobierno español y de la Xunta de Galicia respectivamente.

Referencias bibliográficas

Antonakos A., Liarokapis E., Leventouri T. (2007) Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials* 28: 3043–3054.

- ASTM Standards. (1999) Standard specification for composition of anorganic bone for surgical implants. Annual Book of ASTM Standards F 1581-1599, USA, 13 (01): 893–895.
- Barinov S. M., Rau J. V., Cesaro S. N., Durisin J., Fadeeva I. V. y col. (2006) Carbonate release from carbonated hydroxyapatite in the wide temperature range. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17 (7): 597–604.
- Best S. M., Porter A. E., Thian E. S., Huang J. (2008) Bioceramics: past, present and for the future. *Journal of the European Ceramic Society*, 28: 1319–1327.
- Boanini E., Gazzano M., Bigi A. (2010) Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*, 6 (6): 1882–1894.
- Boutinguiza M., Pou J., Comesaña R., Lusquiños F., de Carlos A. y col. (2012) Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering C*, 32: 478–486.
- Chevalier J., Gremillard L. (2009) Ceramics for medical applications: a picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*, 29: 1245–1255.
- Driessens F. C. M. (1983) Formation and stability of calcium phosphates in relation to the phase composition of the mineral in calcified tissues. En: *Bioceramics of calcium phosphates*, de Groot K. (ed.). CRC Press, Boca Ratón, Florida. 1–32 p.
- Dorozhkin S. V. (2010) Nanosized and nanocrystalline calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*, 6: 715–734.
- FAO. (2012) El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Departamento de Pesca y Acuicultura de la FAO, Roma. 251 p.
- Ferraz M. P., Monteiro F. J., Manuel C. M. (2004) Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 2: 74–80.
- Gibson I. R., Bonfield W. (2002) Preparation and characterization of magnesium/carbonate co-substituted hydroxyapatites. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13 (7): 685–693.
- Goyenvalle E., Aguado E., Nguyen J. M., Passuit N., Le Guehennec L. y col. (2006) Osteointegration of femoral stem prostheses with a bilayered calcium phosphate coating. *Biomaterials*, 27 (7): 1119–1128.
- Hench L. L. (1991) Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, 74: 1487–1510.
- Herliansyah M. K., Hamdi M., Ide-Ektessabi A., Wildan M. W., Toque J. A. (2009) The influence of sintering temperature on the properties of compacted bovine hydroxyapatite. *Materials Science and Engineering C*, 29: 1674–1680.
- Huang J., Lin Y. W., Fu X. W., Best S. M., Brooks R. A. y col. (2007) Development of nano-sized hydroxyapatite reinforced composites for tissue engineering scaffolds. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18 (11): 2151–2157.
- ISO 13779-3: 2008 Implants for surgery-hydroxyapatite - Part 3: chemical analysis and characterization of crystallinity and phase purity. 19 p.

- Ito A., Nakamura S., Aoki H., Akao M., Teraoka K. y col. (1996) Hydrothermal growth of carbonate-containing hydroxyapatite single crystals". *Journal of Crystal Growth*, 163 (3): 311–317.
- Ivanova T. I., Frank-Kamenetskaya O. V., Koltsov A. B., Ugolkov V. L. (2001) Crystal structure of calcium-deficient carbonated hydroxyapatite. Thermal decomposition. *Journal of Solid State Chemistry*, 160: 340–349.
- Joschek S., Nies B., Krotz R., Göpferich A. (2000) Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials*, 21 (16): 1645–1658.
- Kim H. M., Kim Y., Park S. J., Rey C., Lee H. M. y col. (2000) Thin film of low-crystalline calcium phosphate apatite formed at low temperature. *Biomaterials*, 21 (11): 1129–1134.
- LeGeros R. Z., Bonel G., LeGeros J. P. (1978) Types of "H₂O" in human enamel and in precipitated apatites. *Calcified Tissue Research*, 26 (1): 111–118.
- LeGeros, R. Z. (1991) Calcium phosphates in oral biology and medicine. En: *Monographs in oral sciences*, Myers H. (ed.). Karger, Basel, 15: 82–107.
- LeGeros R. Z., LeGeros J. P. (1993) Dense hydroxyapatite. En: *An introduction to bioceramics*, Hench L. L., Wilson J. (eds.). World Scientific, Singapore, 1: 139–180.
- Leventouri, T., Chakoumakos, B. C., Papanearchou N., Perdikatsis, V. (2001) Comparison of crystal structure parameters of natural and synthetic apatites from neutron powder diffraction. *Journal of Materials Research*, 16 (9): 2600–2606.
- Leventouri T. (2006) Synthetic and biological hydroxyapatites: crystal structure questions. *Biomaterials*, 27: 3339–3342.
- Li H., Ng B. S., Khor K. A., Cheang P., Clyne T.W. (2004) Raman spectroscopy determination of phases within thermal sprayed hydroxyapatite splats and subsequent in vitro dissolution examination. *Acta Materialia*, 52 (2): 445–453.
- Li Z. Y., Lam W. M., Yang C., Xu B., Ni G. X. y col. (2007) Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*, 28 (7): 1452–1460.
- Linhart W., Peters F., Lehmann W., Schwarz K., Schilling A. F. y col. (2001) Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, 54 (2): 162–171.
- Marie P. J. (2006) Strontium ranelate: a physiological approach for optimizing bone formation and resorption. *Bone*, 38 (2): S10–S14.
- Mayer I., Schneider S., Sydney-Zax M., Deutsch D. (1990) Thermal decomposition of developing enamel. *Calcified Tissue International*, 46 (4): 254–257.
- Mkukuma L. D., Skakle J. M. S., Gibson I. R., Imrie C. T., Aspden R. M. y col. (2004) Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral: an investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-

- temperature X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy. *Calcified tissue international*, 75 (4): 321–328.
- Moriguchi T., Nakagawa S., Kaji F. (2008) Reaction of ca-deficient hydroxyapatite with heavy metal ions along with metal substitution. *Phosphorus Research Bulletin*, 22: 54–60.
- Movasaghi Z., Rehman S., Rehman I. U. (2007) Raman spectroscopy of biological tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*, 42: 493–541.
- Olszta M. J., Cheng X., Jee S. S., Kumar R., Kim Y. Y. y col. (2007) Bone structure and formation: a new perspective. *Materials Science & Engineering R-Reports*, 58: 77–116.
- Nelson D. G. A., Featherston J. D. B. (1982) Preparation, analysis and characterization of carbonated apatites. *Calcified Tissue International*, 34: 69–81.
- Patterson, A. L. (1939) The diffraction of X-rays by small crystalline particles. *Physical Review*, 56: 978–982.
- Paul W., Sharma C. P. (2006) Nanoceramic matrices: biomedical applications. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 2 (2): 41–48.
- Penel G., Leroy G., Rey C., Bres E. (1998) MicroRaman spectral study of the PO_4 and CO_3 vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcified Tissue International*, 63 (6): 475–481.
- Redey S. A., Razzouk S., Rey C., Bernache-Assollant D., Leroy G. y col. (1999) Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45 (2): 140–147.
- Redey S. A., Nardin M., Bernache-Assollant D., Rey C., Delannoy P. y col. (2000) Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. *Journal of Biomedical Materials Research*, 50 (3): 353–364.
- Rehman I. U., Smith R., Hench L. L., Bonfield W. (1994) FT-Raman spectroscopic analysis of natural bones and their comparison with bioactive glasses and hydroxyapatite. *Bioceramics*, 7: 80–84.
- Rhee S. H. (2002) Synthesis of hydroxyapatite via mechanochemical treatment. *Biomaterials*, 23 (4): 1147–1152.
- Rude R. K., Gruber H. E. (2004) Magnesium deficiency and osteoporosis: animal and human observations. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15 (12): 710–716.
- Šarić M., Piasek M., Blanuša M., Kostial K., Ilich J. Z. (2005) Sodium and calcium intakes and bone mass in rats revisited. *Nutrition*, 21 (5): 609–614.
- Shi J., Klocke A., Zhang M., Bismayer U. (2005) Thermally-induced structural modification of dental enamel apatite: decomposition and transformation of carbonate groups. *European Journal of Mineralogy*, 17 (5): 769–776.
- Siddharthan A., Seshadri S. K., Sampath Kumar T. S. (2005) Rapid synthesis of calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles by microwave irradiation. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 18 (2): 110–113.

- Suchanek W., Yoshimura M. (1998) Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *Journal of Materials Research*, 13: 94–117.
- Vallet-Regí M., González-Calbet J. M. (2004) Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Progress in Solid State Chemistry*, 32: 1–31.
- Vijayalakshmi U., Rajeswari S. (2006) Preparation and characterization of microcrystalline hydroxyapatite using sol gel method. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs*, 19 (2): 57–62.

Nanopartículas de fosfato cálcico de origen marino para aplicaciones biomédicas

Mohamed Boutinguiza^{1*}, Antonio Riveiro¹, J. del Val¹, Rafael Comesaña², Fernando Lusquiños¹, Juan Pou¹

¹ Departamento de Física Aplicada. E.E.I. Campus Lagoas- Marcosende, Universidad de Vigo, 36310, España.

² Departamento de Ingeniería de Materiales, Mecánica Aplicada y Construcción. E.E.I. Campus Lagoas- Marcosende, Universidad de Vigo, 36310, España.

*mohamed@uvigo.es

Resumen

La obtención de biomateriales que facilitan o intervienen en corregir o solucionar defectos en los huesos es uno de los objetivos claves en el desarrollo de nuevos implantes ortopédicos basados en el uso de fosfatos cálcicos a escala nanométrica. Pero el papel de los biomateriales nanoestructurados de fosfato cálcico no queda restringido a solucionar problemas óseos, sino que éstos participan en muchas otras estrategias para la curación o el diagnóstico de enfermedades. Una alternativa para la obtención y desarrollo de este tipo de biomateriales son los materiales obtenidos a partir de fuentes naturales, como puede ser la parte osificada de peces procedentes de la actividad pesquera. La parte mineral del tejido duro de los vertebrados está compuesta fundamentalmente por fosfato cálcico que se encuentra en forma de hidroxapatita (HA) carbonatada, tanto en huesos, como en dientes y tendones, para conferirles estabilidad, dureza y funcionalidad. En los seres vivos las nanopartículas de fosfato cálcico se forman mediante el proceso de biomineralización, en el que macromoléculas orgánicas regulan la nucleación, el crecimiento, la morfología y la ordenación de cristales inorgánicos de tamaño

nanométrico. Dada la similitud con la composición química del tejido duro de los vertebrados, el fosfato cálcico tiene un uso amplio como biomaterial. En este capítulo presentamos un resumen sobre la aplicación de los fosfatos cálcicos de origen biogénico, así como los resultados de trabajos realizados en varios proyectos de investigación para obtener y caracterizar nanopartículas de fosfato cálcico a partir de residuos procedentes de la pesca.

1. Introducción

Los materiales nanométricos tienen propiedades físicas, químicas y biológicas distintas a las que presentan los mismos materiales masivos o a escala molecular o atómica. Esta peculiaridad relacionada con manipular la materia a escala nanométrica abre un gran abanico de aplicaciones en las distintas ramas de la tecnología, la medicina y la ciencia. En el caso particular de los fosfatos cálcicos, dada la similitud de su composición química con la de la parte inorgánica de los tejidos duros de los vertebrados, encuentran una amplia aplicación en áreas de ortopedia, odontología, cirugía maxilofacial, etc. Pero no sólo la composición está detrás del éxito de los fosfatos cálcicos en las aplicaciones biomédicas, sino también el tamaño de los mismos. Pues las partículas de fosfato cálcico de tamaño micrométrico presentan áreas superficiales (alrededor de 2 a 5 m²/g) bastante inferiores a las partículas de fosfato cálcico nanométrico (en torno a 100 m²/g) (Padilla y col., 2008), además de una menor resorción ósea observada en cristales micrométricos de hidroxapatita (HA) sintética que la que se le atribuye a la parte mineral del hueso (Kalita y col., 2007). La HA de tamaño submicrónico (180 nm) presenta una rugosidad superficial menor que la HA nanométrica (67 nm), mientras que el ángulo de contacto de la HA nanométrica es significativamente inferior al de la HA submicrónica; otras diferencias incluyen el tamaño de los poros en las partículas, que es varias veces inferior en la HA nanométrica (Webster y col., 2000). En síntesis, estas diferencias de tamaño dan lugar a diferencias en las propiedades, y por tanto, en un comportamiento distinto en una aplicación determinada. Así, se sabe que la rugosidad en la superficie estimula la función de los osteoblastos, mientras que la presencia de la porosidad favorece la osteoinducción (Sato y Webster, 2004). Por otra parte, el sinterizado de fosfato tricálcico (β -TCP) en forma de polvo

nanométrico a baja temperatura arroja mejores resultados en cuanto a propiedades mecánicas dando lugar a una mayor densificación que cuando se usa β -TCP en forma de granos micrométricos (Lin y col., 2007). En la misma dirección apuntan los resultados histológicos de sustitución ósea realizada con biocomposites basados en HA, evidenciando mejores resultados de biocompatibilidad y osteointegración cuando se usa HA nanométrica (Zhou y col., 2006, Khanna y col., 2011). Es evidente que el aumento de la fracción de las fronteras de grano en los fosfatos cálcicos de tamaño nanométrico contribuye a aumentar la adhesión de los osteoblastos, la proliferación y la mineralización. Estos resultados indican que los fosfatos cálcicos nanométricos presentan mejores comportamientos en aplicaciones biomédicas que sus correspondientes de tamaño micrométrico, gracias a su mayor área superficial que puede ser determinante para la mejora de ciertas propiedades.

2. Aplicaciones de los fosfatos cálcicos nanométricos

Una de las aplicaciones más relevantes de los fosfatos cálcicos es la de material de aporte en reparaciones óseas y relleno en defectos óseos. El uso de implantes en las sociedades industrializadas se incrementa conforme aumenta la esperanza de vida de la población, siendo el injerto óseo el tipo de trasplante de tejidos más numeroso después de los trasplantes de tejido sanguíneo (Shegarfi y Reikeras, 2009). A modo de ejemplo, para ilustrar la magnitud del uso de implantes, en 2003 se realizaron más de 700.000 implantes dentales en Estados Unidos y más de 1.300.000 en Europa (Estéban-Tejada y col., 2009). En el mayor número de los casos estos implantes son metálicos, siendo el titanio y sus aleaciones el material más utilizado. El titanio es un material bioinerte por lo que a lo largo de los años se han ensayado diferentes tipos de recubrimientos para mejorar la osteointegración de los implantes fabricados a partir del titanio y sus aleaciones. Entre estos materiales, los fosfatos cálcicos, y la HA en particular, han demostrado una gran capacidad de mejora de la interacción entre el implante y el tejido óseo. Por otra parte, los implantes metálicos en muchas ocasiones presentan complicaciones debido a la aparición de infecciones causadas por microorganismos como bacterias y hongos resistentes a los antibióticos. Se adhieren a la superficie del implante formando una capa conocida en la literatura científica como "biofilm"

que envuelve el implante como cuerpo extraño (Kiedrowski y Horswill, 2011). En muchas ocasiones conllevan al fracaso de los implantes y, en otras, da lugar a complicaciones que pueden suponer hasta la muerte del paciente (Stevens y col., 2009), además del enorme gasto que conlleva el tratamiento de las infecciones. Por ello, los implantes se suelen recubrir de algún tipo de fosfato cálcico que mejore sus funcionalidades. Cuanto más se aproximan las propiedades del recubrimiento a las del hueso natural, menos rechazo presenta el cuerpo ante el implante. Asimismo se ha estudiado el uso de los fosfatos cálcicos nanométricos para favorecer la remineralización de esmalte dañado y por consiguiente su reparación (Huang y col., 2011). El uso de este material nanométrico en pastas dentales podría promover la remineralización del esmalte desmineralizado además del efecto blanqueante que puede producir en el mismo (Roveri y col., 2009, Lv y col., 2007).

Otra de las aplicaciones de las nanopartículas de fosfato cálcico es la de liberación de medicamentos, pues representan la opción más natural para la liberación de fármacos en las terapias óseas. Los materiales fabricados a partir de nanopartículas poseen grandes superficies específicas y un volumen de poros, tal que permite transportar una gran concentración de fármacos. Suponen uno de los nanomateriales más seguros y biocompatibles ensayados hasta el momento (Singh y col., 2009) y presentan buena capacidad de adsorción a las biomoléculas (Saito y col., 2013). Su naturaleza porosa, que no muestra cambios con el pH ni presenta hinchamiento, las convierten en vehículos ideales para el transporte de principios activos. Por otra parte, las distintas variedades de estequiometría de los fosfatos cálcicos nanométricos permiten distintas cinéticas de liberación de medicamentos, lo que posibilita variar el tiempo de liberación de fármacos que va desde horas a meses (Loomba y Singh-Sekhon, 2015). Además de liberar medicamentos, las nanopartículas de fosfato cálcico se pueden utilizar también para realizar otras funciones de manera simultánea, tales como su uso como agentes de contraste para la detección de enfermedades, en propiedades terapéuticas, como agentes bactericidas, etc. (Uskoković y Desai, 2013). El esquema de la Figura 1 ilustra la funcionalización de una nanopartícula para cumplir varias tareas de manera simultánea (Epple y col., 2010).

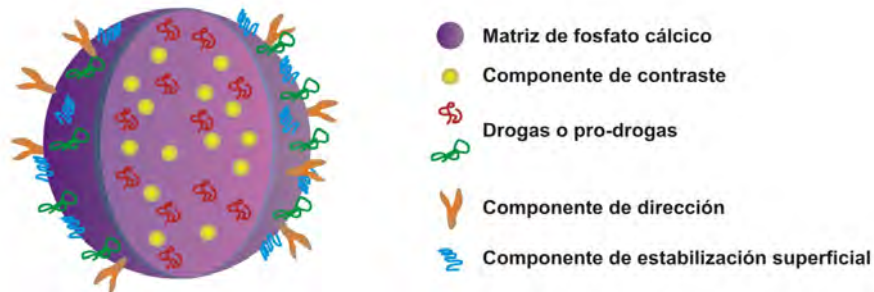


Figura 1. Ilustración de una nanopartícula de fosfato cálcico funcionalizada para cumplir varios objetivos (modificada de Epple y col., 2010 con permiso de The Royal Society of Chemistry).

Para recuperar la funcionalidad de determinados tejidos dañados ya sea por enfermedades o por envejecimiento, la ingeniería de tejidos pretende recuperar dicha funcionalidad a partir del diseño y la construcción de andamios o estructuras a partir biomateriales que favorezcan la adhesión, la proliferación y diferenciación de las células. Aunque las estrategias de preparar una estructura con el propósito de ser utilizada en huesos pueden ser diversas, la presencia de nanopartículas de fosfato cálcico es indispensable para que se pueda imitar en la medida de lo posible la regeneración del hueso. En este sentido, la estructura de la parte esponjosa del hueso o hueso trabecular es más fácil de reproducir que la parte compacta, ya que esta última presenta una estructura más compleja; por ello, las técnicas de ingeniería tisular actuales son capaces de desarrollar estructuras o andamios que imitan con bastante acierto la parte esponjosa del hueso con presencia de poros, como el que se muestra en la Figura 2, realizado mediante la técnica de prototipado rápido (Leong y col., 2003).

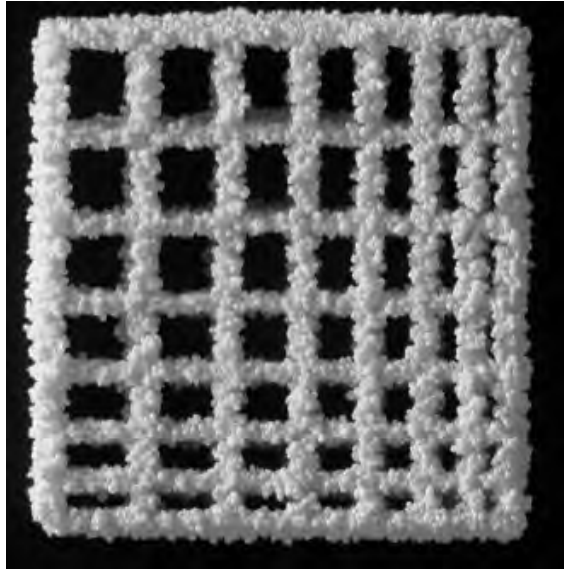


Figura 2. Imagen de un andamio para regeneración ósea (*bonescaffold*) con presencia de poros fabricado mediante la técnica de prototipado rápido (Boutinguiza y col., 2003).

3. Nanopartículas de fosfato cálcico a partir de espinas de pescado

Para las aplicaciones mencionadas anteriormente, especialmente aquéllas que implican la solución de problemas en huesos o dientes, la semejanza de las nanopartículas de fosfato cálcico a las que forman parte del hueso humano es crucial para el éxito de tales aplicaciones. Dicha semejanza abarca la estructura, la morfología, el tamaño de cristales, etc. Una opción es utilizar nanopartículas de origen biológico, ya que probablemente conserven propiedades inherentes a las nanopartículas de su origen biogénico, como pueden ser el tamaño de cristal, la composición, el grado de cristalinidad, etc. Pues el hueso se puede considerar como un ensamblado de distintos niveles de siete unidades estructurales jerárquicas que van desde la escala macro hasta la escala nanométrica, pasando por unidades de tamaño micrométrico, tal y como se ilustra en la Figura 3 que corresponde a la secuencia de formación de las espinas del pez cebra (Cui y col., 2007). ¿Pero, por qué es tan importante la escala nanométrica en el hueso?. En varios estudios se ha demostrado que los nanocompuestos naturales tienen una estructura mecánica en la que los tamaños nanométricos de los minerales cumplen la función de dotarlos

de resistencia y solidez, además de una gran tolerancia a los defectos (Gao y col., 2003, Grupta y col., 2006). Otra función capital de los fosfatos cálcicos nanométricos para los organismos es la de proporcionar iones de calcio y ortofosfato que son necesarios para una amplia variedad de funciones metabólicas (Dorozhkin, 2009), en las cuales se proporcionan o consumen iones de ortofosfato y calcio en un proceso continuo de resorción y formación de HA nanométrica por parte de los osteoclastos y osteoblastos respectivamente (Dorozhkin, 2007, Olszta y col., 2007).

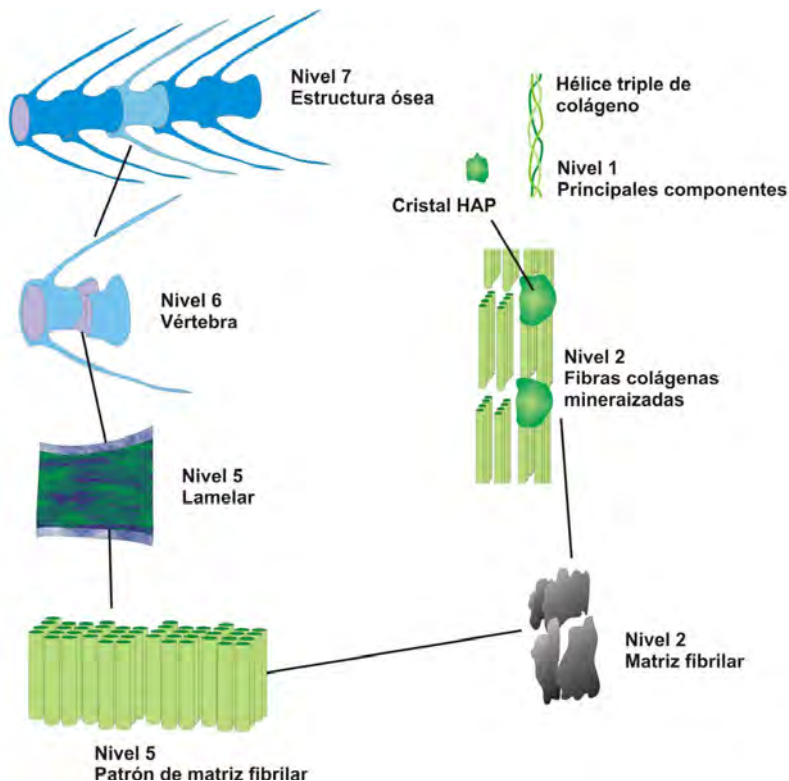


Figura 3. Siete niveles de organización jerárquica del esqueleto del pez cebra. Nivel 1.- cristales aislados y parte de fibras de colágenos con estructura de triple hélice. Nivel 2.- Fibras de colágeno mineralizadas. Nivel 3.- Matriz de fibras de colágeno mineralizado con una periodicidad de bandas estriadas de 60-70 nm. Nivel 4.- Dos patrones de matrices de fibras. Nivel 5.- Estructura laminar en la vértebra. Nivel 6.- Una vértebra. Nivel 7.- Espinas (modificada de Cui y col., 2007 con permiso de Elsevier).

Los métodos y técnicas de síntesis de nanopartículas permiten controlar el tamaño y la morfología de las mismas mediante los parámetros y condiciones empleados. A grosso modo, las técnicas de producción de

nanopartículas se pueden clasificar en dos grandes grupos. Los métodos basados en la aproximación “de abajo hacia arriba” (bottom-up), agrupan fundamentalmente a métodos químicos que parten ensamblando pequeñas unidades hasta obtener material a escala nanométrica. Dentro de este grupo existen diversas técnicas y métodos para la síntesis y obtención de nanopartículas de fosfato cálcico, entre las cuales se pueden destacar: el método sol-gel, la síntesis hidrotermal o la irradiación con microondas. El método sol-gel se basa en la preparación de una suspensión coloidal (sol) de precursores y la gelificación del sol para formar una red dentro de una fase líquida continua (gel). En la síntesis hidrotermal los precursores son calentados en agua por encima de su punto de ebullición, lo que genera una presión superior a la atmosférica (normalmente moderada) y favorece la reacción de las especies utilizadas. En el método de irradiación con microondas se utilizan campos eléctricos de alta frecuencia para calentar el material cargado eléctricamente como los iones en un sólido o las moléculas polares en un solvente para acelerar así las reacciones. Los métodos basados en la aproximación “de arriba hacia abajo” (top-down) agrupan fundamentalmente a métodos físicos que parten de un blanco de material macroscópico para reducirlo hasta porciones nanométricas. Dentro de estas técnicas se puede citar: la molienda, la evaporación térmica, la deposición química en fase de vapor, la ablación láser, etc.

En el marco de los trabajos llevados a cabo en varios proyectos de investigación (IBEROMARE, PROTEUS y MARMED) cuyo objetivo principal era la revalorización de subproductos o residuos procedentes de la pesca, los autores de este capítulo hemos empleado el láser como herramienta para obtener nanopartículas de fosfato cálcico a partir de espinas de pescado. Para ello, hemos utilizado como fuente de fosfato cálcico blancos de espinas de distintas variedades de peces, previamente tratadas para eliminar la materia orgánica y conservar solamente la parte mineral de las espinas. Los blancos fueron irradiados con varias fuentes láser con distintas longitudes de onda y bajo diferentes condiciones, para obtener nanopartículas de fosfato cálcico siguiendo procesos físicos distintos según las condiciones utilizadas.

Una de las estrategias experimentadas consiste en la fractura mediante láser de partículas micrométricas. Para ello se han utilizado partículas obtenidas a partir de esqueletos de pez espada (*Xiphias gladius*) previamente

calcinados para eliminar la materia orgánica. Los análisis realizados al material resultante mostraron que se compone fundamentalmente de HA. La morfología de estas partículas se muestra en la Figura 4. Con las partículas se preparó una solución en agua destilada con pH en torno a 8'0 para mantener la estabilidad de la HA. La solución obtenida se mantuvo bajo la acción de ultrasonidos para evitar la aglomeración de las partículas precursoras. Finalmente la solución preparada se sometió a la irradiación de un haz láser. Aunque se han utilizado diferentes fuentes láser que operan en modo pulsado y en modo continuo, aquí reflejamos los resultados obtenidos con un láser pulsado con una duración de pulsos de 1'0 ms y una energía por pulso de 2'0 a 8'0 mJ; y otro que opera en modo continuo con una irradiancia de aproximadamente 10^6 W/cm².

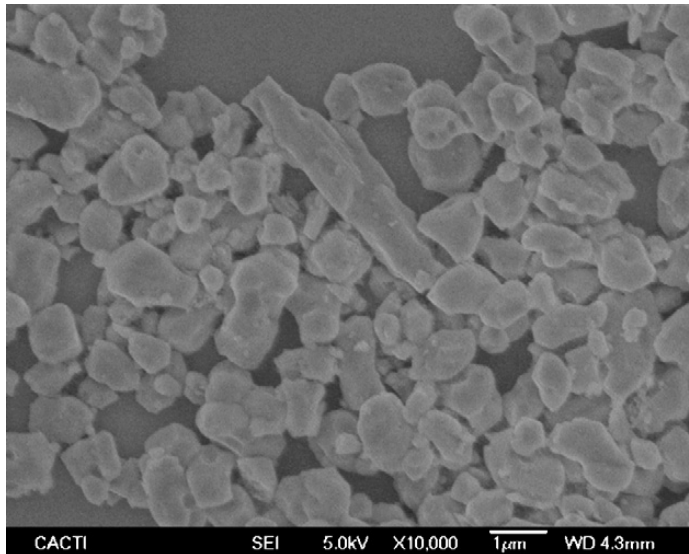


Figura 4. aspecto de las partículas precursoras procedentes de esqueleto de pez espada (*Xiphias gladius*) antes de ser irradiadas con láser (Boutinguiza y col., 2009).

Cuando el haz láser incide en las partículas, éstas experimentan una rápida subida de temperatura que puede dar lugar a la fractura del material, su fusión y/o evaporación dependiendo de los parámetros utilizados. En el proceso que nos ocupa, la acumulación de pulsos sucesivos que inciden en las partículas suponen un proceso fototérmico mediante el cual se acumula energía en forma de calor en el material (HA), que no se disipa con la suficiente rapidez debido a su baja conductividad térmica. Este

confinamiento térmico, produce un sobrecalentamiento local que se puede traducir en la fractura por tensión térmica y fundamentalmente en la fusión de las partículas precursoras. Partículas de tamaño nanométrico fracturadas por este mecanismo junto con otras de menor tamaño, y cuya forma redondeada indica que se han formado a partir de la fusión del material de partida y su rápida solidificación, se pueden apreciar en la micrografía de la Figura 5. Con este método se han obtenido nanopartículas de fosfato cálcico de apenas varios nanómetros, como se puede apreciar en la Figura 6, donde se han señalado varias nanopartículas que muestran claramente los patrones que revelan la red cristalina a partir de las zonas de contraste entre la interferencia constructiva y destructiva: que permite además medir la distancia entre planos cristalinos e identificar el tipo de material. El inserto en la misma figura corresponde a la transformada rápida de Fourier (FTT) que ha sido utilizada para calcular la distancia entre los planos cristalinos. En este caso los cálculos revelan la presencia de nanopartículas cristalinas de HA junto con otras de fosfato tricálcico (TCP). Para determinadas aplicaciones como las regeneraciones óseas, la combinación de HA y TCP resulta de gran interés. Aunque la HA presenta una excelente biocompatibilidad, promoviendo una directa adhesión y proliferación de los osteoblastos, es, sin embargo, demasiado estable en los fluidos corporales; por otra parte el TCP presenta una velocidad de disolución demasiado rápida como para que se formen las uniones óseas. Por ello, resulta de especial interés usar una mezcla de ambos materiales con tamaño nanométrico, de modo que los tejidos óseos puedan crecer ocupando los huecos que deja el TCP después de su rápida disolución (Epple y col., 2010).

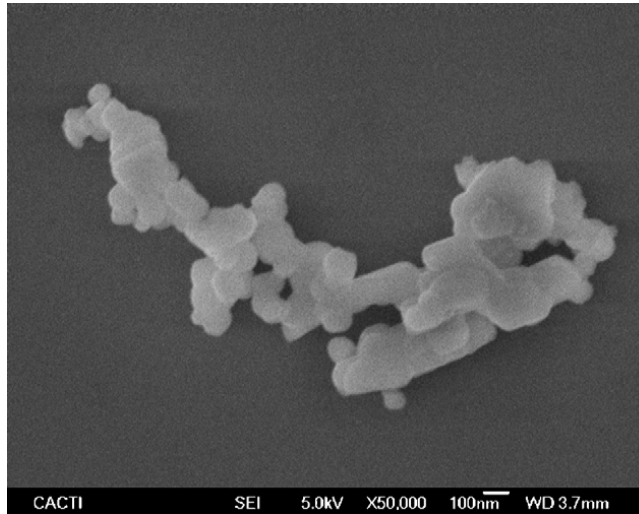


Figura 5. Aspecto de nanopartículas obtenidas mediante fragmentación de espinas de pescado utilizando un láser continuo (Boutinguiza y col., 2009).

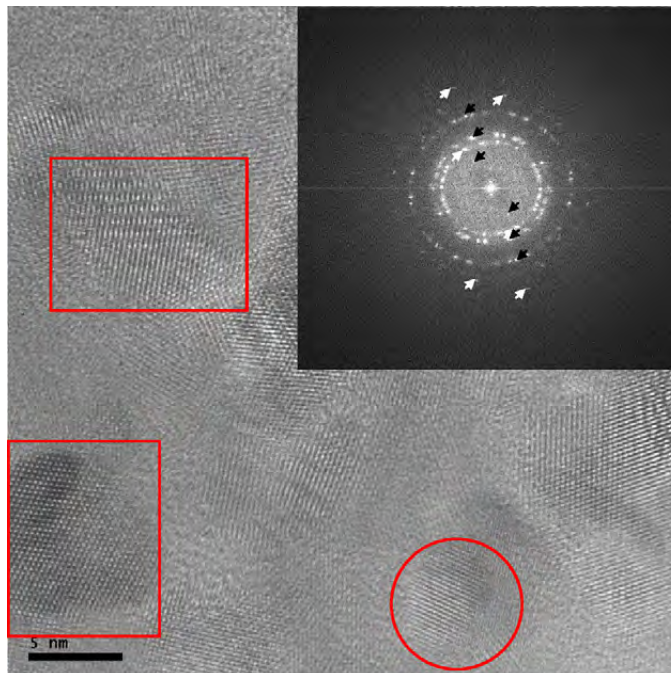


Figura 6. Micrografía de HRTEM que permite distinguir nanopartículas cristalinas de unos pocos nanómetros obtenidas con láser pulsado. El inserto corresponde a su transformada rápida de Fourier (FTT) que permite identificar la presencia de fosfato tricálcico, TCP (flechas blancas) e HA (flechas negras) (Boutinguiza y col., 2009).

En esta técnica hay parámetros cruciales en la formación de las nanopartículas, como la energía por pulso y la duración del mismo, o la potencia por unidad de área sobre la superficie, llamada también irradiancia del haz láser sobre las partículas. Cuando la irradiancia se incrementa hasta valores de $2 \cdot 10^6 \text{ W/cm}^2$ se obtienen fundamentalmente nanopartículas con morfología esférica acompañadas de la presencia ocasional de partículas con la misma forma pero de tamaño submicrónico, como se pueden observar en la Figura 7. Los análisis llevados a cabo en varios grupos de partículas revelan que su composición fundamental es de Ca y P, pero no son de naturaleza cristalina. Su morfología prácticamente esférica indica que se han formado a partir de material fundido debido a la alta temperatura que experimentan, donde la tensión superficial juega un papel fundamental en conferirles tal forma, mientras que su enfriamiento rápido, favorecido por la temperatura del medio acuoso circundante, contribuye a que sean amorfas. Sin embargo, la relación de Ca/P medida en diversas partículas arroja un valor de 1'82 algo inferior al valor medido para las partículas precursoras de 1'86. Este valor más elevado para la HA de origen biológico que para la HA sintética se explica por la presencia de carbonatos sustituyendo a los iones fosfato. La HA biogénica es carbonatada y menos cristalina que la sintética debido a la incorporación de determinados iones como Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , etc. en cantidades muy reducidas, que no sólo afectan a su cristalinidad, sino que también modifican su carga superficial, su solubilidad y otras propiedades que determinan su comportamiento en presencia de fluidos corporales, siendo por tanto, esenciales en el metabolismo del hueso (Šupová, 2014). La disminución de la relación Ca/P observada en las nanopartículas obtenidas mediante láser se puede explicar mediante la transformación parcial de la HA en TCP cuya relación Ca/P es más baja. Esta transformación normalmente se produce a temperaturas superiores a los $1000 \text{ }^\circ\text{C}$, que pueden ser alcanzadas y superadas por las partículas cuando el tiempo de interacción con el láser es relativamente elevado (del orden de los ms).

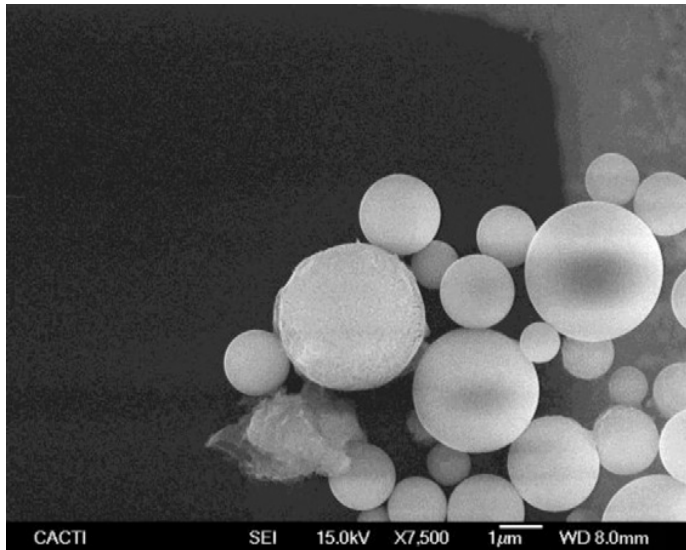


Figura 7. Micrografía SEM que muestra la morfología de partículas de fosfato cálcico obtenidas mediante láser con una irradiancia aproximada de 10^6 W/cm² (Boutinguiza y col., 2011).

4. Conclusiones

La nanotecnología permite obtener o diseñar materiales con nuevas propiedades que solamente se dan a escala nanométrica. A esta escala, los materiales pueden presentar propiedades físicas, químicas y biológicas peculiares y únicas, que difieren tanto de las propiedades del material precursor masivo como de los átomos y moléculas del mismo material. Este es el caso de los fosfatos cálcicos nanométricos de origen natural, como los procedentes de espinas de pescado, que presentan excelentes propiedades mecánicas, físicas, químicas, etc., y que además son semejantes a las de los huesos y tejido dentario. Gracias a estas propiedades singulares de los fosfatos cálcicos nanométricos como la elevada área superficial, la biocompatibilidad, la bioactividad, su morfología y tamaño semejantes a los constituyentes íntimos del hueso humano, etc., encuentran uso en un amplio espectro de aplicaciones. Se usan en la regeneración ósea, en recubrimientos de implantes, en ingeniería tisular, en farmacología como vehículos de liberación de medicamentos, etc.

Una fuente natural de los fosfatos cálcicos nanométricos son las espinas de pescado, que se encuentran disponibles como subproducto de la actividad pesquera y pueden ser extraídos por distintos métodos y técnicas. La técnica de obtención o de síntesis de las nanopartículas determina el control sobre la morfología y la composición de las mismas. En trabajos realizados en el marco de varios proyectos (IBEROMARE, PROTEUS y MARMED) hemos utilizado el láser como herramienta para obtener nanopartículas de fosfato cálcico a partir de espinas de pescado como material precursor. Aunque las nanopartículas obtenidas conservan su composición de fosfato cálcico, según su estructura cristalina, se pueden clasificar en amorfas y cristalinas; las amorfas generalmente se forman en un proceso de sobrecalentamiento que da lugar a la fusión del material seguida de la solidificación con geometría generalmente redondeada, mientras que las cristalinas suelen ser alargadas y similares al material de partida.

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de FANDICOSTA S.A (Moaña, España) y de CETMAR que suministraron las espinas, así como la asistencia técnica del personal del CACTI (Universidad de Vigo) y la del Dr. A. de Carlos, del Departamento de Bioquímica, Genética e Inmunología (Universidad de Vigo).

Este trabajo ha sido financiado parcialmente por los programas INTERREG III A (SP1.P151/03, PROTEUS), POCTEP (0330_IBEROMARE_1_P) y Programa de Cooperación Transnacional del Arco Atlántico. (MARMED - 2011-1/164) de la Unión Europea, así como por la Xunta de Galicia (CN2012/292, POS-A/2013/161).

Referencias bibliográficas

- Boutinguiza M., Lusquiños F., Riveiro A., Comesaña R., Pou J. (2009) Hydroxyapatite nanoparticles obtained by fiber laser-induced fracture. *Applied Surface Science*, 255: 5382–5385.
- Boutinguiza M., Pou J., Lusquiños F., Comesaña R., Riveiro A. (2011) Laser-assisted production of tricalcium phosphate nanoparticles from biological and synthetic hydroxyapatite in aqueous medium. *Applied Surface Science*, 257: 5195–5199.

- Cui, F. Z., Li Y., Ge J. (2007) Self-assembly of mineralized collagen composites. *Materials Science and Engineering R*, 57: 1–27.
- Dorozhkin S. V. (2007) Calcium orthophosphates. *Journal of Materials Science*, 42: 1061–1095.
- Dorozhkin S. V. (2009) Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. *Materials*, 2: 399–498.
- Epple M., Ganesan K., Heumann R., Klesing J., Kovtun A. y col. (2010) Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry*, 20: 18–23.
- Esteban-Tejeda L., Cabal B., Malpartida F., López-Piriz R., Torrecillas R. y col. (2012) Soda-lime glass-coating containing silver nanoparticles. *Journal of the European Ceramic Society*, 32: 2723–2729.
- Feng-Huei L., Chun-Jen L., Ko-Shao C., Jui-Sheng S. (1999) Preparation of a biphasic porous bioceramic by heating bovine cancellous bone with $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ addition. *Biomaterials*, 20: 475–484.
- Gao H., Ji B. Jager I. L., Arz E., Fratzl P. (2003) Materials become insensitive to flaws at nanoscale: Lessons from nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 100: 5597–5660.
- Gupta H. S., Seto J., Wagermaier W., Zaslansky P., Boesecke P. y col. (2006) Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 103: 17741–17746.
- Huang S., Gao S., Cheng L., Yu H. (2011) Remineralization potential of nano-hydroxyapatite on initial enamel lesions: an in vitro study. *Caries Research*, 45: 460–468.
- Kalita S. J., Bhardwaj A., Bhatt H. A. (2007) Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering C*, 27: 441–449.
- Khanna, R., Katti, K. S., Katti, D. R. (2011) Bone nodules on chitosan-polygalacturonic acid-hydroxyapatite nanocomposite films mimic hierarchy of natural bone. *Acta Biomaterialia*, 7: 1173–1183.
- Kiedrowski M. R., Horswill A. R. (2011) New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241: 104–121.
- Leong K. F., Cheah C. M, Chua C. K. (2003) Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*, 24 (13): 2363–78.
- Lin K., Chang J., Lu J., Wu W., Zeng Y. (2007) Properties of $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ bioceramics prepared using nanosized powders. *Ceramics International*, 33: 979–985.
- Lomba, L., Singh-Sekhon, B. (2015) Calcium phosphate nanoparticles and their biomedical potential. *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology*, 4: 2–12.

- Lv K., Zhang J., Meng X., Li X. (2007) Remineralization effect of the nano-HA toothpaste on artificial caries. *Key Engineering Materials*, 330-332: 267-270.
- Olszta M. J., Cheng X., Jee S. S., Kumar R., Kim Y. Y. y col. (2007) Bone structure and formation: a new perspective. *Materials Science and Engineering R*, 58: 77-116.
- Padilla S., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regí M. (2008) High specific surface area in nanometric carbonated hydroxyapatite. *Chemistry of Materials*, 20: 5942-5944.
- Roveri N., Battistella E., Bianchi C. L., Foltran, I., Foresti, E. y col. (2009) Surface enamel remineralization: biomimetic apatite nanocrystals and fluoride ions different effects. *Journal of Nanomaterials*, 2009: 9 p.
- Saito M., Kurosawa Y., Okuyama T. (2013) Scanning electron microscopy-based approach to understand the mechanism underlying the adhesion of dengue viruses on ceramic hydroxyapatite columns. *PLoS ONE*, 8 (1): e53893.
- Sato M., Webster T. J. (2004) Nanobiotechnology: implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications. *Expert Review of Medical Devices*, 1: 105-114.
- Shegarfi H., Reikeras O. (2009) Review article: bone transplantation and immune response. *Journal of Orthopaedic Surgery (Hong Kong)*, 17 (2): 206-211.
- Singh N., Manshian B., Jenkins G. J. S., Griffiths S. M., Williams P. M. y col. (2009) Nano Genotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials. *Biomaterials*, 30: 3891-3914.
- Stevens K. N. J., Crespo-Biel O., Van Den Bosch E. E. M., Dias A. A., Knetsch M.L.W., y col. (2009) The relationship between the antimicrobial effect of catheter coatings containing silver nanoparticles and the coagulation of contacting blood. *Biomaterials*, 30: 3682-3690.
- Šupová, M. (2014) Isolation and preparation of nanoscalebioapatites from natural sources: a review. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14: 546-563.
- Uskoković V., Desai T. A. (2013) Phase composition control of calcium phosphate nanoparticles for tunable drug delivery kinetics and treatment of osteomyelitis. Part 1: preparation and drug release. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101 (5): 1416-1426.
- Webster T. J., Ergun C., Doremus R. H., Siegel R. W., Bizios R. (2000) Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51: 475-483.
- Zhou D. S., Zhao K. B., Li Y., Cui F. Z., Lee I. S. (2006) Repair of segmental defects with nano-hydroxyapatite/collagen/PLA composite combined with mesenchymal stem cells. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 21: 373-384.

Materiais à base de fosfato de cálcio de origem marinha para aplicações biomédicas

Clara Piccirillo, Paula Castro, Manuela Pintado

Centro de Biotecnologia e Química Fina – Laboratório Associado, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa/Porto, Rua Arquitecto Lobão Vital, 4202-401 Porto, Portugal.

*mpintado@porto.ucp.pt

Resumo

A hidroxiapatite é o componente mais importante dos ossos humanos e animais (60 a 70% em peso do osso) e por isso tem sido largamente usada, na sua forma sintética, para promover a formação de osso novo e favorecer o crescimento de células osteoblásticas. Atualmente, a hidroxiapatite e derivados de fosfato de cálcio naturais podem ser obtidos a partir de subprodutos marinhos, tendo sido exploradas fontes como as espinhas e escamas de alguns peixes. Ao longo deste capítulo será apresentada a forma de obtenção e principais características visando a sua aplicação na biomédica.

1. Introdução

A hidroxiapatite (HA), que corresponde à fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, é um composto químico largamente utilizado como um biomaterial, mais especificamente, como um substituto de osso. A HA é o principal componente dos ossos humanos e animais, que constitui geralmente entre 60 e 70% em peso do osso, enquanto a parte restante é constituída por colagénio. A percentagem de HA no osso pode variar de acordo com as espécies animal considerada; no entanto, outros parâmetros tais como a idade do animal também podem afetar tal percentagem.

A utilização da HA artificial como substituto de osso é habitualmente a escolha mais imediata, uma vez que replica a composição mineral e o comportamento de osso humano. A HA é altamente biocompatível e osteocondutora, promovendo a formação de osso novo e favorecendo o crescimento de células osteoblásticas.

A biocompatibilidade da HA e a sua eficácia como um material substituto de osso pode depender de vários fatores, sendo a proporção entre o cálcio e o fósforo particularmente importante. A razão estequiométrica para a HA é 1'67; portanto, no material utilizado como um substituto de osso, a proporção deve também estar tão próximo quanto possível de este valor. Outra característica que pode influenciar a biocompatibilidade da HA é a possível presença de outros elementos, como sejam componentes menores presentes na estrutura da HA (Figura 1).



Figura 1. Alguns dos elementos existentes como componentes menores na estrutura de HA que podem influenciar a sua biocompatibilidade. A imagem corresponde ao pó de HA obtida de espinhas de sardinha por calcinação (cedido por Piccirillo e col., 2013c).

O magnésio, por exemplo desempenha um papel fundamental, uma vez que tem um efeito sobre reabsorvabilidade da HA; a calcificação do próprio osso e, por conseguinte, a sua fragilidade pode também ser afetada. O cloro e o sódio, por outro lado, podem ter uma influência positiva sobre reabsorvabilidade e a osteoporose, respetivamente. O flúor também pode ser importante, uma vez que pode promover a osteointegração (Piccirillo e col., 2013c). Características de superfície, tal como a porosidade, também

podem ser um fator determinante. Geralmente, uma superfície com elevada porosidade favorece o crescimento celular, pela existência de uma maior área disponível para a adesão e migração de osteoblastos; isto, por sua vez, facilita a proliferação das células. Em alguns casos, contudo, um material com uma estrutura mais densa e mais sólida é necessário, pois exhibe melhores propriedades mecânicas; este é o caso em que a HA tem de ser utilizado para a substituição de ossos duros ou para aplicações de suporte de carga elevada.

Outros fosfatos para além da HA também são usados como biomateriais (Dorozhkin, 2010). A HA é frequentemente utilizada combinada com o fosfato tricálcico (FTC), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, em ambas as suas formas α e β . O FTC tem geralmente pior biocompatibilidade, mas apresenta uma reabsorvabilidade superior; portanto, uma combinação dos dois materiais pode ser utilizada com vantagens funcionais - um fosfato de cálcio bifásico (FCB). Estudos sobre materiais FCB são relatados na literatura (Dorozhkin, 2012); sendo a sua formação favorecida quando a razão atômica entre o cálcio e o fósforo é inferior a 1'67 e mais perto de 1'5 (para valores estequiométricos HA e FTC, respetivamente) (Kannan e col., 2006). Vários produtos FCB com ambas as formas α e β estão disponíveis comercialmente. A fluoroapatite (FAP), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$, por outro lado, tem também sido considerada, especialmente para materiais dentários. Devido à sua baixa solubilidade, a FAP é mais estável em ambientes fisiológicos ligeiramente ácidos; ao mesmo tempo, no entanto, a sua biocompatibilidade é comparável à de HA. Além disso, pode mostrar um comportamento anti-bacteriano para ambos os grupos de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

A maioria das HA e materiais de fosfato de cálcio utilizados hoje são sintéticos, tendo vindo a ser usados vários métodos para preparar os compostos anteriormente referidos.

Em paralelo com evolução da produção sintética, uma série de processos foram desenvolvidos para preparar HA partir de fontes naturais. Nas próximas seções, uma descrição detalhada será dada de HA e / ou biomateriais de fosfato de cálcio preparadas usando fontes marinhas como materiais de partida.

As fontes consideradas neste capítulo serão sobretudo as espinhas e escamas de peixes.

2. Hidroxiapatite e fosfatos de cálcio de espinhas e escamas de peixe

A obtenção de HA a partir de fontes como as espinhas de peixes apresenta inúmeras vantagens. A indústria de processamento de peixe gera quantidades crescentes de subprodutos cujo tratamento representa um sério desafio para a sociedade, devido às potenciais questões ambientais e de segurança associadas. Assim a extração de compostos de valor acrescido a partir destes subprodutos alimentares tem sido cada vez mais incentivada e desenvolvida. Além disso, a disponibilidade de fósforo necessário para a produção de HA sintética pode ser crítica, pois, relatos recentes têm mostrado que, se consumido no ritmo atual, as reservas mundiais estarão esgotados em cerca de 50 anos (Gilbert, 2009).

Assim, o desenvolvimento de métodos alternativos que não requerem a utilização de novo fósforo, mas, pelo contrário, permitem utilizar fósforo naturalmente presente em subprodutos é particularmente valioso.

Considerando-se as características do material, a HA de origem natural pode realmente ser uma melhoria em comparação com as sintéticas. Na verdade, vários elementos menores (ex: sódio, magnésio), podem ser necessários para melhorar desempenho como biomaterial. No caso da HA extraída a partir de espinhas de peixes, não é necessário adicionar estes elementos, pois já estão presentes na matriz estrutural.

Piccirillo e col. (2013d) asseguraram pela primeira vez a extração e caracterização de apatites e materiais à base de fosfato de tricálcico a partir de espinhas de bacalhau.

Assim as espinhas obtidas de várias zonas do peixe foram lavados em água quente, limpas e secas e esmagados manualmente até obter pedaços mais pequenos. Para obter a HA segue-se um processo de calcinação a temperaturas entre 900 e 1200 °C, com velocidades de aquecimento de 5 °C / min. O material obtido caracterizou-se como um material bifásico de HA e fosfato tricálcico ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e $\beta\text{-Ca}_2(\text{PO}_4)_3$) em percentagem em peso de cerca de 75:25, um material amplamente utilizado em implantes biomédicos. A natureza bifásica foi confirmada por FTIR (Figura 2) com evidência dos picos pertencentes aos iões fosfato da HA em 1092, 1046, 980, 962, 601, 568 e 473 cm^{-1} e do pico a 1122 cm^{-1} , característico de β -TCP.

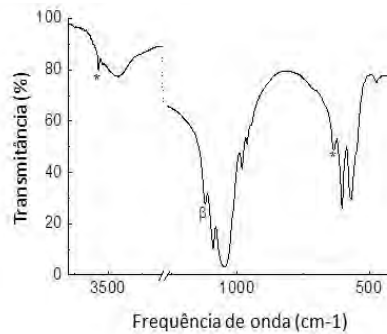


Figura 2. Espectros de infravermelho de amostra espinha de bacalhau calcinada sem tratamento. *: ligação OH vínculo; Pico marcado com β : β - fosfato tricálcio (Piccirillo e col., 2013d).

As suas características de microestrutura, nas espinhas tratadas termicamente a 1000 °C foram observadas com recurso a Microscopia Eletrónica de Varimento (MEV) (Figura 3). Duas estruturas de grãos, claramente diferentes, podem ser observadas na micrografia: os menores, arredondadas, com dimensões de 300-500 nm, e outros muito maiores e mais cristalinos, com uma forma mais alongada. Estes cristais em forma de agulha tendem a orientar-se em conjunto com o eixo maior alinhado na mesma direção. Estas características confirmam que duas fases diferentes estão presentes no material.

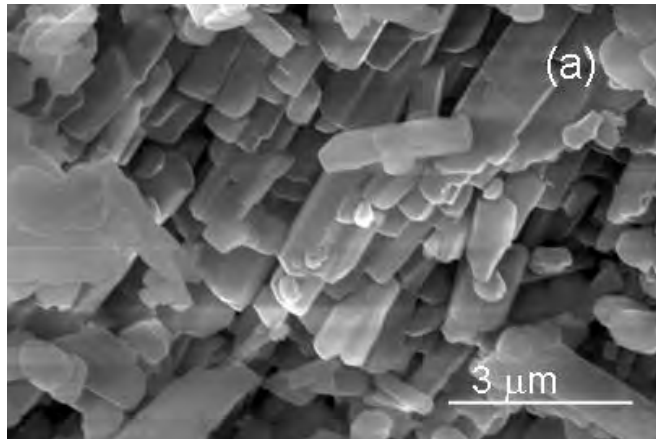


Figura 3. Micrografias obtidas por MEV de amostra espinha de bacalhau calcinada sem tratamento (Piccirillo e col., 2013d).

As análises elementares das amostras calcinadas a 1000 °C mostram que os outros iões, tais como o de sódio, cloro e flúor, estão presentes no material

naturalmente, o que pode constituir uma vantagem, assumindo que a concentração mais elevada de flúor pode favorecer a osteointegração, e a de sódio e de cloro pode ter um efeito benéfico sobre a osteoporose e reabsorvabilidade, respetivamente, como já foi referido anteriormente.

O tratamento das espinhas em soluções com diferentes iões antes da sua calcinação permitiu observar uma evidente alteração da composição do material. Assim, foi obtida HA simples, clorapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$) e fluorapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) utilizando soluções com excesso de CaCl_2 e de NaF, respetivamente. Os tratamentos em solução afetam igualmente a microestrutura do material – o cloro parece não favorecer a sinterização, enquanto o flúor parece aumentar, e levar a um produto sinterizado com grãos alongados e bem orientados.

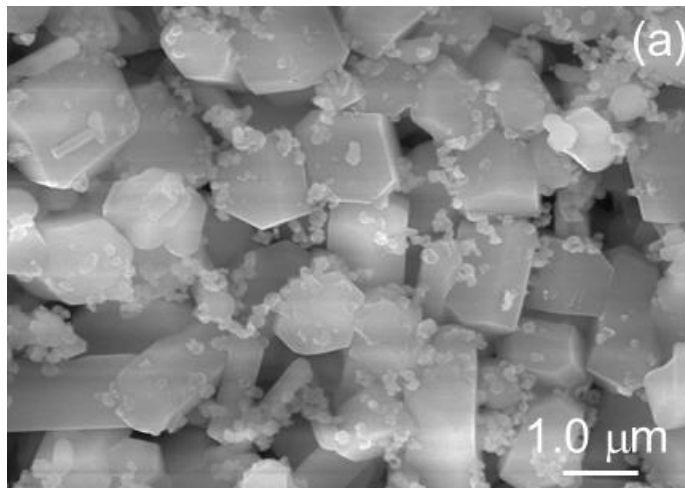
Ainda, Piccirillo e col. (2014a) exploraram o potencial de obtenção de HA de outras espécies de peixe, neste caso de sardinha. O processo de produção de conservas é realizado por diferentes métodos, que variam em toda a Europa. De acordo com a tradição mediterrânea, a sardinha e a cavala são peixes enlatados através de um processo que envolve a salga, lavagem, cozedura e lavagem das latas, passos que representam de 10, 35, 15 e 40% do total dos efluentes de conservas, respetivamente, que atualmente não é devidamente valorizada (Ferraro e col., 2014). A indústria de conservas Portuguesas gera uma quantidade de espinhas e escamas de sardinhas, existindo um elevado potencial de valorização. Neste trabalho, os compostos à base de fosfato usados em biomedicina foram extraídas de espinhas e escamas de sardinhas europeias (*Sardina pilchardus*) pela primeira vez. Diferentes partes do mesmo peixe foram usadas para a extração destes tipos de materiais. As espinhas e as escamas comportaram-se de forma muito diferente com o processamento, gerando materiais diferentes quando calcinados entre 600-1000 °C.

As espinhas originaram uma mistura de hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HA) e fosfato β -tricálcico β - $\text{Ca}_2(\text{PO}_4)_3$, β -TCP), com um teor mais elevado de β -TCP obtido com o aumento da temperatura. Este material bifásico tem um elevado valor acrescentado, tal como é empregue como biocerâmico;

A partir das escamas, por outro lado, também foi produzido um material à base de HA contendo cloro (clorapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$, ClAp) através de um processo de calcinação simples. Para eliminar o efeito dos sais,

em particular da alta concentração de sódio e cloreto, foi realizado um processo de lavagem combinado com a calcinação. A clorohidroxiapatite (ClAp) também é usado em biomedicina, devido à sua reabsorção melhorada, propriedades mecânicas e bioatividade. Esta foi a primeira vez que ClAp de origem marinha foi produzida.

A Figura 4 mostra algumas micrografias para amostras de espinhas calcinadas as 700 °C e a 1000 °C. Pode ver-se que, após a calcinação a 700 °C, o material é constituída por grãos muito pequenos, organizados de forma regular com diâmetro de 50-100 nm e alguns grãos alongados, ligeiramente maiores, com diâmetro de 100-200 nm de comprimento (Figura 4a). Após aquecimento a 1000 °C, a amostra mostra que ocorreu aumento considerável do tamanho de grão (Figura 4b). Estes resultados mostram que a concentração relativa de cada fase e a morfologia da amostra pode ser ajustada através da variação da temperatura de calcinação.



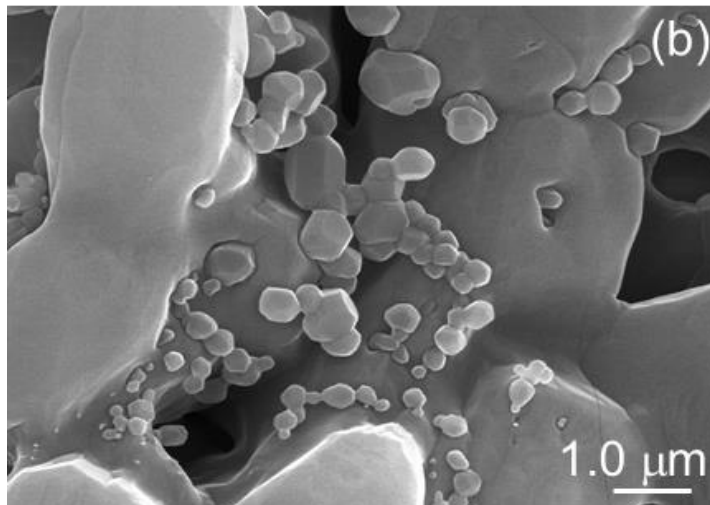


Figure 4. Micrografias obtidas por MEV de amostra espinha de sardinha calcinada a: (a) 700 °C e (b) 1000 °C. Ampliação de (a) a 50.000x, é 5 vezes superior a (b), a 10.000x (Piccirillo e col., 2014a).

As amostras de escamas representadas na Figura 5, mostram que para as amostras calcinadas a 700 °C (a) e a 1000 °C (b) são muito diferentes das observadas para as espinhas calcinadas à mesma temperatura. As escamas calcinadas a 700 °C, consistem de grãos grandes angulares, muito cristalinos com dimensão de mm, que parecem ter lados paralelos de comprimento, e em muitos casos, observa-se uma secção transversal hexagonal evidente, o que sugere que eles são HA (Figura 5). Estes são cobertos com cristais equiaxiais muito menores, até 100 nm de diâmetro, que se assemelham aos nanocristais β -TCP observadas nas imagens de espinhas.

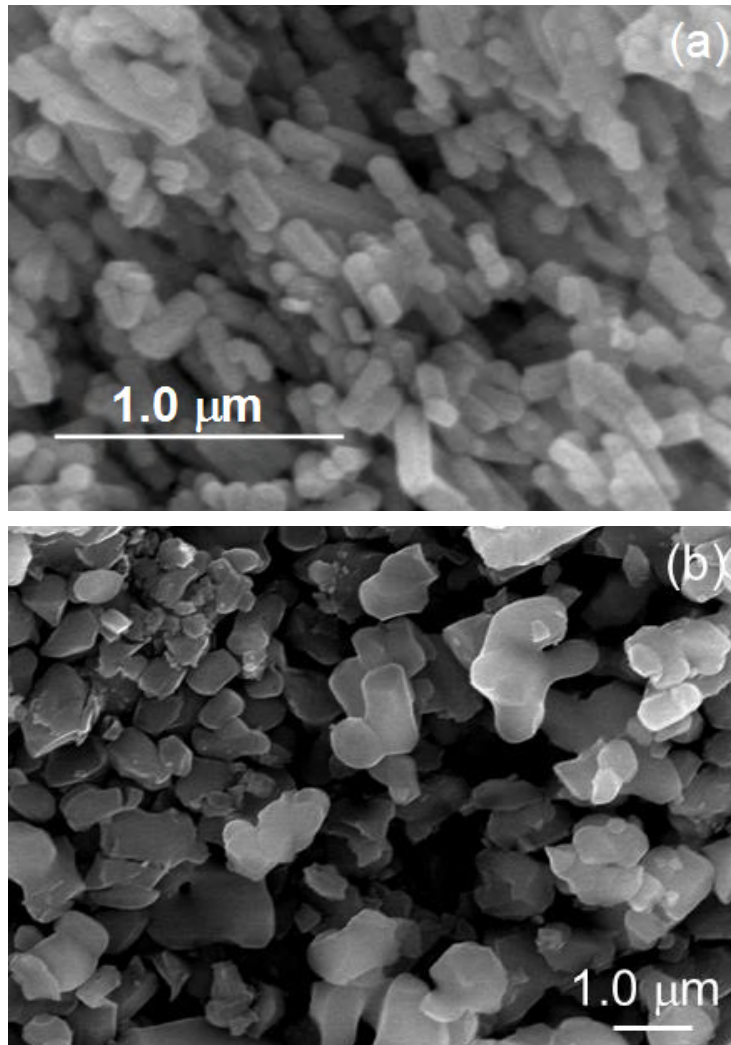


Figure 5. Micrografias obtidas por MEV de amostra espinha de sardinha calcinada a: (a) 700 °C e (b) 1000 °C. (Picirillo e col., 2014a).

3. Modificação de hidroxiapatite de espinhas de peixe para aplicações diferenciadas

A hidroxiapatite pode servir como base para outros materiais diferenciados, com utilizações para áreas que saem da esfera da biomédica, e o potencial é também muito vasto.

Um tratamento com soluções de prata e sucessiva calcinação levou à introdução do metal na estrutura do material. Usando soluções relativamente diluídas, obteve-se um material contendo β -fosfato de cálcio (β -Ca₃(PO₄)₂, β -TCP) e HA (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂, HA), contendo prata (Ag) na sua composição, o qual demonstrou propriedades antibacterianas (Piccirillo e col., 2015a).

Ainda com prata, mas recorrendo a soluções mais concentradas e com tratamento mais prolongado, permitiu a obtenção de materiais à base de fosfato de prata com capacidade antibacteriana induzida pela luz para estirpes Gram-positivos e Gram-negativos (*Staphylococcus aureus* multirresistente (MRSA), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), com taxas de inativação de até 99'999% sob luz UV, e de 99% para *E. coli* sob luz branca, revelando o seu potencial para a esterilização de superfícies (Piccirillo e col., 2015b). O mesmo material mostrou também propriedades fotocatalíticas, sendo capaz de degradar o corante azul de metileno sob luz branca e luz UV, com capacidades superiores a produtos existentes no mercado (e.g., bióxido de titânio P25), reforçando o potencial para aplicações na área da tecnologia ambiental. Num trabalho anterior havia sido já conseguida a modificação da HA com titânio, material que havia já revelado capacidade fotocatalítica (Piccirillo e col., 2013a). As propriedades fotocatalíticas deste material eram muito boas, apesar da baixa concentração do titânio. Na área da remediação ambiental, de referir também que a HA foi usada como matriz de imobilização de bactérias resistentes e com capacidade de adsorver metais, tendo expandido a utilização de sistemas combinados de HA-microrganismos para a remoção de metais pesados de águas contaminadas com cádmio e zinco (Piccirillo e col., 2013b).

A partir da espinha de bacalhau foi também possível obter como um simples processo de tratamento com soluções de Fe(II), com calcinação a 700 °C, um composto formado por HA, óxido de ferro e fosfato misto de cálcio e ferro, com ótimas propriedades de absorção UV, tanto nas gamas

UVA e UVB, o qual foi utilizado na formulação de um creme protetor solar (Piccirillo e col., 2014b). Devido às suas propriedades de absorção seria classificado como um produto de 5 estrelas, de acordo com o sistema de classificação Boots UVA, sendo fotoestável e não causando irritação ou formação de eritema quando em contacto com a pele humana, tendo sido a primeira vez que um produto à base de HA foi desenvolvido e validado como uma prova de conceito.

Agradecimentos

Aos projetos ValorPeixe (QREN, AdI 13634), InSolEx (MRT-CT-2006-036053), iCOD (QREN AdI I466), Pest-C CTM / LA0011 / 2013 e Peste-OE / EQB / LA0016 / 2011. C. Piccirillo agradece à FCT pela bolsa de investigação (SFRH / BPD / 86483/2012), enquanto RC Pullar agradece ao programa FCT Ciência 2008.

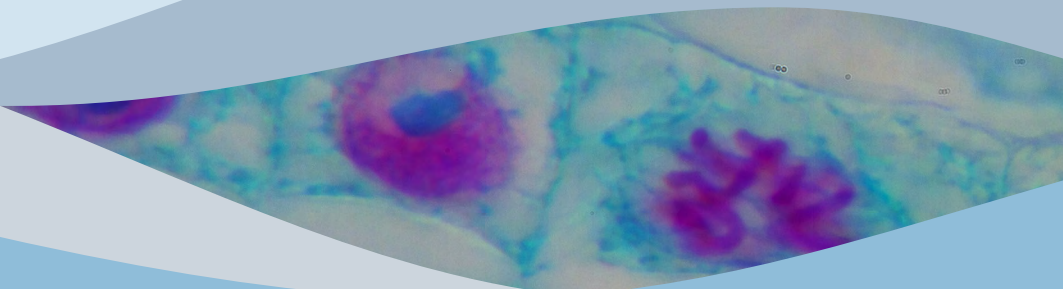
Referências bibliográficas

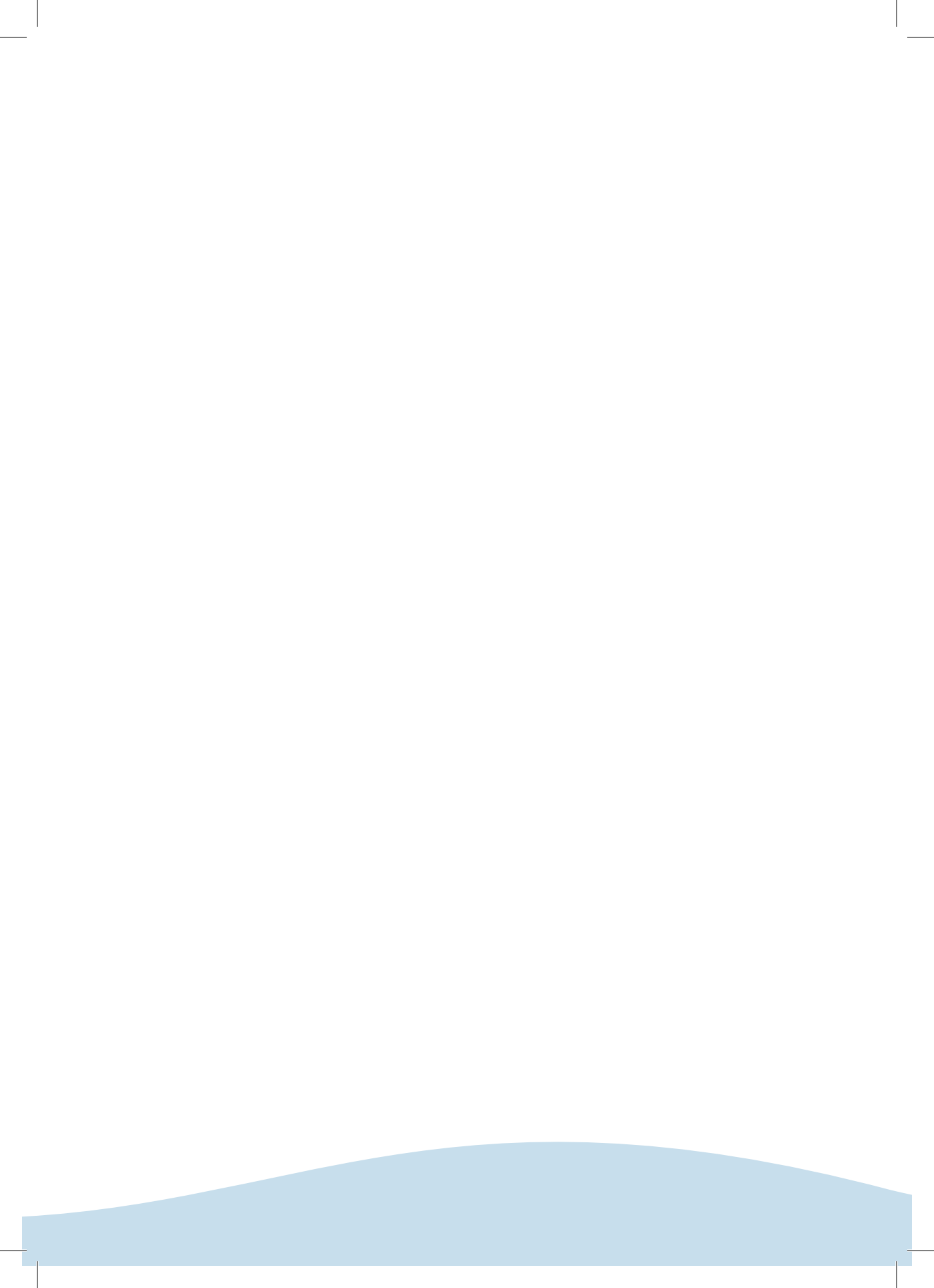
- Dorozhkin S. V. (2010) Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31: 1465-1485.
- Dorozhkin, S. V. (2012) Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates. *Acta Biomaterialia*, 8 (3): 963–977.
- Ferraro V., Carvalho A. P., Piccirillo C., Santos M. M., Castro P. M. e col. (2013) Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues — A review. *Materials Science and Engineering C*, 33 (6): 3111–3120.
- Gilbert, N. (2009) The disappearing nutrient. *Nature*, 461:716–718.
- Kannan S., Rocha J. H. G., Agathopoulos S. Ferreira J. M. F. (2007) Fluorine-substituted hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Acta Biomaterialia*, 3: 243–249.
- Piccirillo C., Dunnill C. W., Pullar R. C., Tobaldi D. M., Parkin I. P. e col. (2013a) Calcium phosphate-based materials of natural origin showing photocatalytic activity. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(21): 6452-6461.
- Piccirillo C., Pereira S. A., Marques A. P., Pullar R. C., Tobaldi D. M. e col. (2013b) Bacteria immobilization on hydroxyapatite surface for heavy metals removal. *Journal of Environmental Management*, 121: 87-95.
- Piccirillo C., Pintado M. E., Castro P. M. L. (2013c) Hydroxyapatite and calcium phosphates from marine sources: extraction and characterisation. En: *Marine Biomaterials: isolation, characterisation and applications*, Kim S-W. (ed.). CRC-Taylor & Francis. 29-44 p.

- Piccirillo C., Silva M. F., Pullar R. C., Braga da Cruz I., Jorge M. E. e col. (2013d) Extraction and characterization of apatite- and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Materials Science and Engineering C*, 33 (1): 103-110.
- Piccirillo C., Pullar R. C., Tobaldi D. M., Castro P. M. L., Pintado M. M. (2014a) Hydroxyapatite and chloroapatite derived from sardine by-products. *Ceramics International*, 40 (8): 13231-13240.
- Piccirillo C., Rocha C., Tobaldi D. M., Pullar R. C., Labrincha J. A. e col. (2014b) Hydroxyapatite-Fe₂O₃ based material of natural origin as an active sunscreen filter. *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (36): 5999-6009.
- Piccirillo C., Pullar R. C., Tobaldi D. M., Lima-Castro P. M., Estevez-Pintado M. M. (2015a) Silver-containing calcium phosphate materials of marine origin with antibacterial activity. *Ceramics International*, 41 (8): 10152-10159.
- Piccirillo C., Pinto R. A., Tobaldi D. M., Pullar R. C., Labrincha J. A. e col. (2015b) Light induced antibacterial activity and photocatalytic properties of Ag / Ag₃PO₄-based material of marine origin. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 296 (1): 40-47.

Sistemas de Liberação de Fármacos

Liberadores de Fármacos





Polissacarídeos de origem marinha aplicados à libertação controlada de agentes bioativos

Matias J. Cardoso^{1,2}, Rui R. Costa^{1,2}, João F. Mano^{1,2*}

¹ 3B's Research Group – Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, University of Minho, Headquarters of the European Institute of Excellence of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, Avepark – Parque de Ciência e Tecnologia, Zona Industrial da Gandra, 4805-017 Barco GMR, Portugal.

² ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.
*jmano@dep.uminho.pt

Resumo

O mar é uma imensa fonte de recursos. Nele encontramos organismos compostos por diversos materiais com grande aplicabilidade biotecnológica. A exploração do mar como fonte de biomateriais pode ter um impacto positivo no desenvolvimento de novas aplicações biomédicas. Os polissacarídeos de origem marinha, nomeadamente o alginato, o quitosano, o ácido hialurónico e a carragenina, apresentam importantes propriedades biológicas, como a biocompatibilidade, mucoadesividade e ação antimicrobiana. Devido a estas propriedades, estes biomateriais têm sido utilizados na construção de dispositivos de carga para sistemas de libertação controlada de agentes bioativos, entre os quais, partículas, cápsulas e hidrogéis.

1. Introdução

Nos últimos anos verificou-se um interesse crescente por parte das áreas científicas que estudam as aplicações dos biomateriais de origem marinha. Entre eles, os materiais mais estudados são os polissacarídeos, cujo principal

interesse é justificado pela grande biodiversidade, biodisponibilidade e pela simplicidade dos processos de extração e purificação (Pomponi, 1999). A exploração sustentável destes materiais - principalmente na indústria alimentar - tem demonstrado inúmeras vantagens para o desenvolvimento económico e tecnológico. A exploração destes recursos também tem como objetivo a conservação do ambiente e a preservação de algumas espécies, pelo que a extração destes materiais seria realizada de uma forma sustentada (Pomponi, 2001). Os biomateriais de origem marinha têm uma grande aplicabilidade na biomedicina, devido às suas características não-citotóxicas, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Silva e col., 2012c). O maior interesse destes compostos de origem marinha deve-se às suas propriedades biológicas e este é um aspeto fundamental para a indústria farmacêutica, pois possibilita a descoberta de um variadíssimo leque de novos compostos de origem biológica com propriedades farmacológicas (Munro e col., 1999, Molinski e col., 2009). Alguns desses compostos são estudados devido às suas propriedades anticancerígenas (Schwartzmann e col., 2001, Jimeno e col., 2004, Newman e Cragg, 2014), tal como o caso de determinados péptidos extraídos de alguns tunicados (Rinehart, 2000) e esponjas (Suárez-Jiménez e col., 2012). Muitos destes compostos já se encontram em fase de ensaios clínicos como por exemplo, a Aplidina (Jimeno, 2002) e a Ecteinascidina 743 (Valoti e col., 1998).

As algas são a principal fonte de polissacarídeos de origem marinha, mas estes podem ser também obtidos a partir do esqueleto de crustáceos e do tecido cartilaginoso de alguns peixes. Os polissacarídeos de origem marinha podem ser descritos como grandes complexos constituídos por diferentes macromoléculas (Laurienzo, 2010, Wijesekara e col., 2011, Ngo e Kim, 2013). Conforme a constituição dos polissacarídeos, estes podem apresentar diferentes estruturas e diferentes propriedades, como a biocompatibilidade, a biodegradabilidade e a capacidade de formar hidrogéis. Os polissacarídeos sulfatados apresentam também atividade biológica entre elas a atividade antioxidante (Barahona e col., 2011), anticoagulante (Ciancia e col., 2010), anticancerígena (Sithranga-Boopathy e Kathiresan, 2010), antiviral (Bouhlal e col., 2011), antialérgica (Vo e col., 2012), antiadesiva, antiangiogénica e anti-inflamatória (Cumashi e col., 2007).

Nos últimos anos verificou-se um aumento na utilização de estruturas baseadas em polissacarídeos de origem marinha nas indústrias alimentar,

cosmética e farmacêutica. No último caso, tem existido um interesse crescente na construção de dispositivos para a incorporação de agentes bioativos em sistemas de libertação controlada (Laurienzo, 2010) (Figura 1). O estudo sistemático destes materiais permitiu a descoberta de novos métodos de modificação química cujo objetivo é aproveitar as atividades biológicas e/ou alterar essas propriedades desses materiais de forma a aumentar a capacidade de incorporar fármacos e aumentar a eficácia da libertação. Estas modificações podem ser realizadas através de reações químicas ou através da interação com outros polímeros de origem natural e/ou sintética (d'Áyala e col., 2008).

O interesse no estudo de sistemas de libertação controlada com fins terapêuticos reside na possibilidade de desenvolver novos tratamentos menos invasivos, mais personalizados e na diminuição dos riscos de infeção associados às cirurgias convencionais. Existe um interesse em desenvolver novas formulações farmacêuticas, de modo a serem administradas de forma específica e controlada. Este conceito pode ser muito útil em alternativa a tratamentos, como a quimioterapia, que costumam ser agressivos para o paciente, uma vez que estes materiais são de fácil sinalização, podendo ser então possível construir estruturas capazes de libertar biomoléculas de forma localizada. Isto significa também uma menor dosagem de carga do fármaco no dispositivo, que pode levar a uma diminuição drástica dos efeitos secundários causados pelo mesmo (Allen e Cullis, 2004, Brannon-Peppas e Blanchette, 2012). Estes sistemas têm uma grande aplicabilidade na terapia génica, isto é, a capacidade de conseguir tratar uma variedade de doenças hereditárias ou adquiridas com a adição ou silenciamento de um determinado gene. Uma das principais limitações é o desenvolvimento de novos veículos de carga eficazes na libertação do material genético. A utilização de biomateriais pode ser uma boa estratégia para o desenvolvimento de novos agentes de carga em alternativa aos já existentes como os vetores virais que apresentam várias limitações e algum risco para o paciente (Thomas e col., 2003). Os biomateriais de origem marinha têm demonstrado ser capazes de oferecer inúmeras vantagens para o encapsulamento de diversos agentes terapêuticos de origem química e biológica: (i) garantem estabilização e proteção, (ii) aumentam a sua solubilidade, (iii) promovem uma libertação prolongada, e (iv) apresentam grande biocompatibilidade e muitas vezes biodegradabilidade (Kim, 2013).

Os polissacarídeos mais utilizados na construção de sistemas de libertação controlada têm sido o alginato, a carragenina, o quitosano, o ácido hialurónico e o sulfato de condroitina. Nesta contribuição, apresentam-se formas de modificar e adaptar estes biopolímeros para esta aplicação em particular.

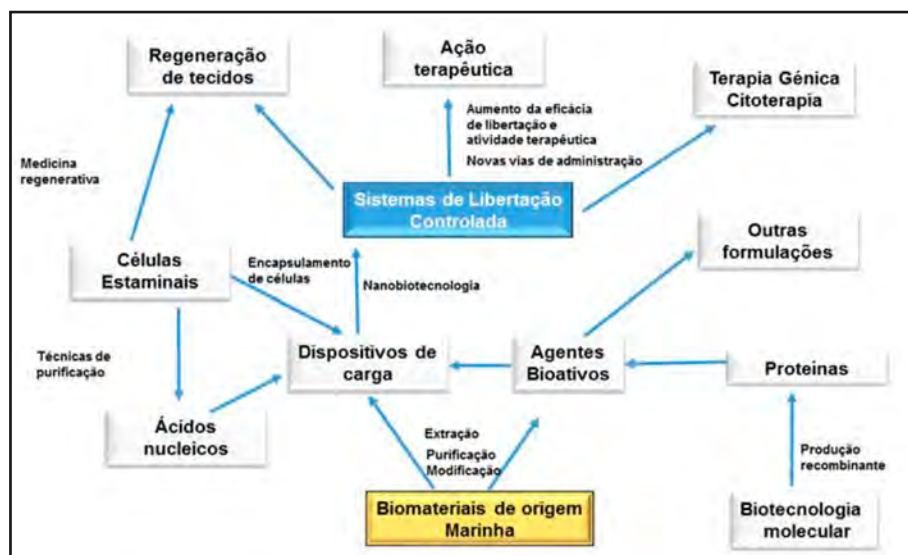


Figura 1. Esquema representativo da relação entre os biomateriais de origem marinha e os sistemas de libertação controlada de agentes bioativos.

2. Polissacarídeos de origem marinha aplicados na libertação controlada de agentes bioativos

2.1 Alginato

O alginato é um polissacarídeo linear extraído da alga castanha e solúvel em água. É composto por uma sequência alternada de unidades ligadas na conformação β -1,4 de resíduos de ácido α -L-gulurónico e ácido β -D-manurónico (Figura 2). O alginato é um material muito utilizado na indústria alimentar como agente promotor de emulsão. É também uma substância aprovada pelas entidades reguladoras não só na indústria alimentar mas também na indústria farmacêutica, onde é utilizado há décadas no fabrico de comprimidos como excipiente (Beneke e col., 2009). A par do quitosano (abordado na Secção 2.2) contempla uma

sensibilidade ao pH que faz com que seja um bom material de construção de dispositivos em sistemas de liberação controlada de fármacos e proteínas (Chen e col., 2004). O alginato apresenta grupos carboxilo que se encontram carregados a valores de pH superiores a 3-4, sendo assim solúveis em condições neutras ou alcalinas. Um dispositivo de carga à base de alginato conseguiria promover uma maior proteção ao agente bioativo das condições no trato gastrointestinal onde o pH é mais ácido (como no estômago) e promover a sua liberação na via intestinal, onde o pH alcalino aumentaria a solubilidade do alginato e a difusão do fármaco (George e Abraham, 2006). O alginato é biocompatível, apresenta baixa toxicidade e uma grande biodisponibilidade, bem como baixos custos de extração e purificação. São estas as principais vantagens que fazem do alginato um dos biopolímeros com maior aplicabilidade biomédica. O alginato é utilizado como material na construção de dispositivos em sistemas de liberação controlada de fármacos e outros agentes bioativos, e também na construção de hidrogéis muito utilizados em tratamentos de regeneração de tecidos e encapsulamento celular (Augst e col., 2006, Lee e Mooney, 2001). Os hidrogéis construídos a partir do alginato têm uma grande aplicação aérea da engenharia de tecidos devido às suas características estruturais muito similares às da matriz extracelular. Esta característica foi já demonstrada como sendo útil em membranas biocompatíveis com a capacidade de incorporar biomoléculas, com o objetivo de aumentar a eficácia de tratamentos de queimaduras (Hamidi e col., 2008).

O alginato pode ser utilizado na construção de microcápsulas para liberação controlada de fármacos. As cápsulas de alginato podem ser construídas por diferentes técnicas, entre elas a esférização por emulsão (Ramadas e col., 2000, Krasaekoopt e col., 2003, Lima e col., 2012) ou por automontagem camada-a-camada (LbL, do inglês layer-by-layer) (Becker e col., 2010, Zhao e col., 2007, Costa e col., 2011). Esta última técnica pode se útil na desconstrução do ambiente fisiológico (Mano, 2015) e tem sido muito explorada na área biomédica (Costa e Mano, 2014). Ao longo dos anos foram apresentados novos métodos de modificação química de modo promover uma melhor incorporação de drogas e proteínas. A incorporação de proteínas é normalmente feita em hidrogéis de alginato complexados com outros tipos de polímeros de como por exemplo o quitosano (d'Ayala e col., 2008).

A utilização do alginato como excipiente na construção de comprimidos tem como principal objetivo promover uma maior proteção e estabilização do fármaco. O alginato de sódio é o tipo de alginato mais utilizado na indústria farmacêutica no fabrico de comprimidos, especialmente quando o fármaco não é solúvel em água. O alginato de sódio pode ser utilizado com o objetivo de prolongar a libertação do fármaco. Estudos utilizando comprimidos contendo ibuprofeno demonstraram que é possível controlar o rácio de absorção dos comprimidos. Utilizando alginato de sódio com diferentes estruturas químicas e diferentes graus de viscosidade foi possível obter uma libertação imediata do fármaco ou prolongar a sua libertação, comprovando que a estrutura química do alginato pode ter influência na velocidade de libertação do agente bioativo (Sirkiä e col., 1994).

Este tipo de polímero permite uma reticulação com os iões de Ca^{2+} através do processo de gelificação ionotrópica, normalmente a pH superiores a 6 (Mandal e col., 2010, Tonnesen e Karlsen, 2002). O Ca^{2+} não é o único ião capaz de iniciar a gelificação ionotrópica do alginato, podendo também ser utilizados iões de bário ou zinco (Russo e col., 2007). Estudos anteriores reportaram que o uso do alginato de sódio na preparação de comprimidos por compressão direta pode prolongar a libertação do fármaco (Giunchedi e col., 2000). A reticulação do alginato de sódio promovida pelos iões de cálcio pode resolver limitações relacionadas com a hidratação (dependente do pH), a dilatação e a erosão do dispositivo. Num ambiente ácido, o gel apresenta um maior grau de viscosidade, o que pode interferir na dissolução do dispositivo, e por sua vez na libertação controlada do fármaco. Os hidrogéis de alginato também têm aplicações na construção de estruturas na forma de pensos para tratamentos de cicatrização. Estes são construídos a partir de hidrogéis obtidos por reticulação iónica, dando origem a uma rede hidrofílica com a capacidade de absorver grandes quantidades de água, aumentando significativamente de tamanho e mantendo a mesma estrutura tridimensional. Vários estudos demonstram que existe uma maior biodisponibilidade dos fármacos encapsulados em hidrogéis do que se o fármaco fosse aplicado no local e assim aumentar a eficácia da cicatrização (Hamidi e col., 2008, Murakami e col., 2010).

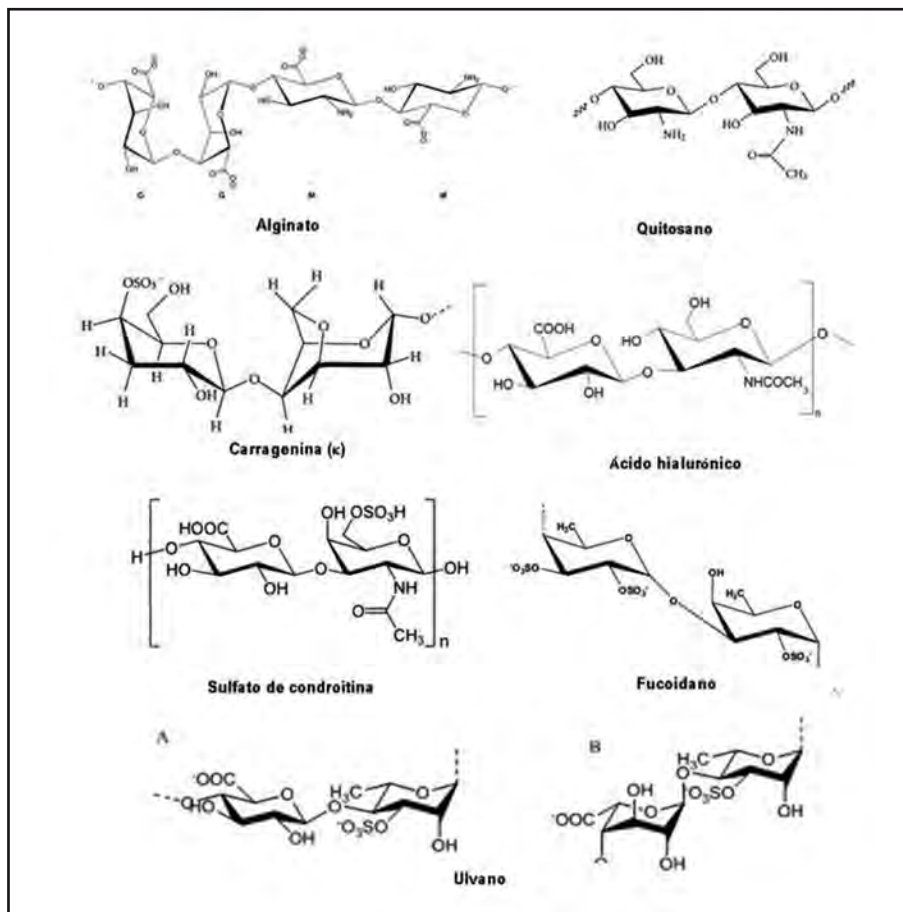


Figura 2. Estrutura química de diferentes polissacarídeos de origem marinha (Alginate: adaptado de Aktar e col., 2014. Quitosano: reproduzido de Andrade e col., 2011. Carragenina: reproduzido de Rezanejade-Bardajee e col., 2011. Ácido hialurônico: reproduzido de Mero e Campisi, 2014. Sulfato de condroitina: adaptado de Zhang e col., 2015. Fucoidano: adaptado de Chen e col., 2015. Ulvano: reproduzido de Jiao e col., 2011). Todos os artigos são distribuídos sob os termos da Creative Commons Attribution.

O alginato é também utilizado na construção de micropartículas com a capacidade de incorporar um agente bioativo, nomeadamente proteínas. Desta forma é possível proteger o agente de qualquer ataque proteolítico e promover uma libertação localizada e controlada.

Existem diferentes mecanismos de libertação do agente bioativo a partir do dispositivo, como as variações da temperatura e do pH e a degradação

enzimática. Estes mecanismos são difíceis de controlar e programar, uma vez que são fatores muito variáveis no corpo humano. Porém, foram desenvolvidos novos mecanismos de libertação, como por exemplo, a libertação estimulada por ultrassons. Um novo tipo de micropartículas de alginato-perfluorocarbono mostrou ter a capacidade de disrupção quando submetidas a uma vibração através de ultrassons (Duarte e col., 2014). Resultados demonstraram uma disrupção destas partículas passado 15 minutos de exposição (Figura 3), sugerindo este tipo de estruturas como um sistema promissor para sistemas de libertação controlada de biomoléculas em terapias baseadas em ultrassons.

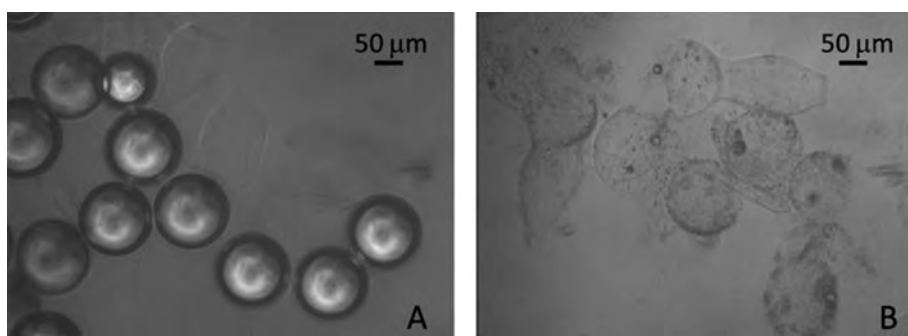


Figura 3. Imagens de microscopia ótica de esferas de alginato antes (A) e depois (B) da exposição às vibrações de ultrassons. Reproduzido com a permissão de (Duarte e col., 2014). Copyright © 2014 American Chemical Society.

O alginato tem a capacidade de criar complexos com outros biomateriais por interações eletrostáticas, modificação química ou por reticulação. Esta capacidade pode ser utilizada na construção de dispositivos de carga mais versáteis para libertação controlada de biomoléculas. Cápsulas construídas a partir de quitosano/PEG-alginato são modelos fiáveis para o encapsulamento de proteínas como a albumina, fazendo com que estas cápsulas sejam candidatas como agentes de carga de proteínas para a libertação controlada (Chandy e col., 1998). A construção de estruturas esféricas de alginato com outro tipo de materiais que não sejam de origem marinha pode ser uma boa estratégia para estender a versatilidade destes sistemas. A poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) é um dos materiais termossensíveis mais utilizados em sistemas de libertação controlada (Schmaljohann, 2006). A sua utilização juntamente com o alginato pode dar origem a dispositivos de carga capazes de libertar biomoléculas mediante estímulos combinado de pH e de temperatura. Estudos utilizando

uma droga modelo reportaram que os dispositivos de alginato-PNIPAAm promovem uma diminuição de libertação quando há uma diminuição da temperatura. O mesmo acontece quando há diminuição do pH, indicando que é possível controlar a permeabilidade da partícula de forma a controlar a libertação do agente bioativo (Shi e col., 2006, Shi e col., 2008a,b).

O alginato é também utilizado na construção de dispositivos de carga para libertação controlada de ácidos nucleicos em tratamentos de terapia génica, principalmente na construção de nanopartículas. Os primeiros sistemas para a libertação controlada de material genético eram à base de vetores virais animais. Estes apresentam inúmeras limitações como a possibilidade de desencadear uma reação imunológica, riscos de infeção, de mutações indesejadas e uma resposta inflamatória por parte do paciente. Estes sistemas apresentam também elevados custos de produção devido à complexidade no processamento dos vetores virais (Thomas e col., 2003). A utilização de polímeros para a construção de complexos com o ácido desoxirribonucleico (ADN) pode ser uma boa estratégia para a construção de sistemas de libertação de material genético mais eficazes. Os polímeros mais utilizados na construção de veículos de carga para libertação de material genético são geralmente de origem sintética, como por exemplo, a polietilamina (PEI), a poli(L-lisina) (PLL), a poli(L-ornitina), a poli(éster-4-hidroxi-L-prolina) e a polipropilamina (Thomas e Klivanov, 2003). A utilização destes materiais na construção de complexos para libertação controlada de material genético apresentam algumas vantagens, dado que as interações electrostáticas entre o polímero e o ADN permite a criação de um complexo estável, ordenado e com a possibilidade de se ajustar o seu tamanho. Os complexos podem ser facilmente sinalizados para uma libertação localizada. Uma das limitações da utilização de materiais de origem sintética é o seu efeito biológico no organismo. Alguns materiais de origem sintética, como o PEI, apresentam elevados níveis de citotoxicidade (Pack e col., 2005). A utilização de materiais de origem natural pode ajudar a ultrapassar algumas dessas limitações. Devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade em alguns casos, e também a possibilidade de formar reticulação iónica através das interações electrostáticas, estes materiais garantem uma maior protecção ao material genético (Liu e col., 2008).

O alginato pode ser utilizado na construção de microcápsulas para o encapsulamento de células, muitas vezes associado a tratamentos de

citoterapia ou simplesmente na criação de microculturas de células em sistemas mais complexos onde não seja possível a utilização de bioreatores. Neste contexto apresentou-se uma nova abordagem na construção de cápsulas para a incorporação de diferentes tipos de células (Correia e col., 2013a,b). As células foram encapsuladas em partículas de alginato reticuladas por gelificação iónica. Depois, as partículas foram revestidas por LbL e o alginato foi posteriormente liquefeito. Juntamente com as células, também foram encapsuladas micropartículas de ácido polilático (PLA) (Figura 4). As micropartículas de PLA servem para garantir a adesão e sobrevivência das células. Os resultados demonstraram uma viabilidade elevada nas células encapsuladas e também a utilidade das cápsulas como sistemas de cultura. Este tipo de sistema apresenta uma grande aplicabilidade, não só ao nível na cultura de células mas também em outras aplicações biomédicas, pois permitirá o encapsulamento de diferentes tipos de células em conjunto com outras biomoléculas como, por exemplo, fatores de crescimento (Correia e col., 2013a).

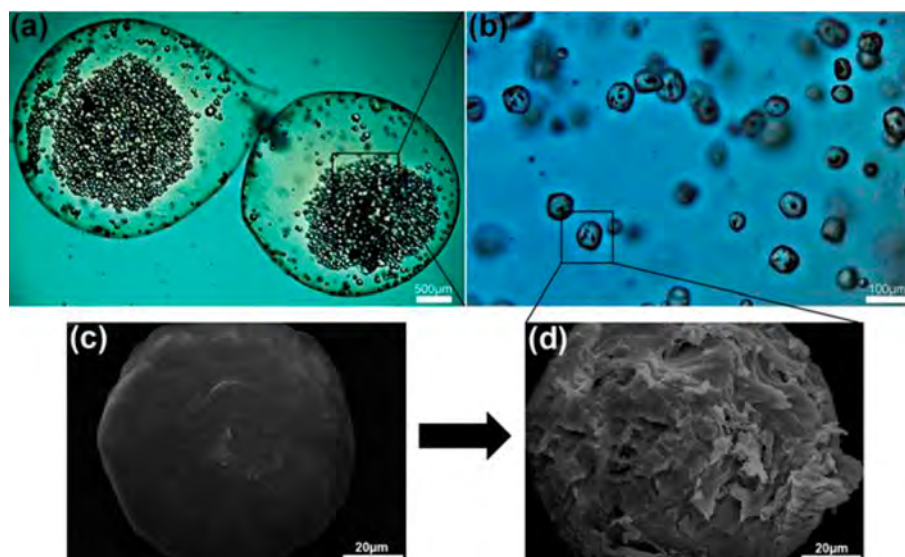


Figura 4. (A) Imagem de microscopia ótica das cápsulas com as células e as micropartículas de PLA no primeiro dia de cultura. (B) Imagem de microscopia ótica das partículas de PLA. (C, D) Imagem de microscopia eletrónica de varrimento das partículas de PLA antes (C) e depois (D) do tratamento por plasma. Reproduzido com a permissão de (Correia e col., 2013a). Copyright © 2013 American Chemical Society.

2.2 Quitosano

O quitosano é um polissacarídeo linear derivado da quitina, um dos polímeros naturais mais abundantes do nosso ecossistema (Bansal e col., 2011). O quitosano é obtido através da desacetilação da quitina dando origem a um composto constituído por cadeias distribuídas aleatoriamente de resíduos de D-glucosamina (unidade desacetilada) e N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada) (Rinaudo, 2006, Alves e Mano, 2008) (Figura 2). O quitosano, como acontece com a quitina, também pode ser degradado pela ação enzimática de enzimas como a quitinase ou a lisozima (Varum e col., 1997). A quitina é o principal composto do exosqueleto dos artrópodes, nos quais são incluídos os insetos e crustáceos como o caranguejo, o camarão e o lavagante, assim como alguns nematodes e fungos. A quitina pode então ser convertida noutros derivados solúveis como o quitosano e o quitosano carboximetilo através de processos químicos como a desacetilação do grupo acetil da N-acetil-D-glucosamina (Jayakumar e col., 2005, Kurita, 2006).

O quitosano apresenta grupos amina sensíveis às variações de pH, apresentado carga positiva a pHs ácidos e sendo neutro a pH alcalino (Mano, 2008). O quitosano é um dos polissacarídeos de origem marinha mais utilizados na biomedicina, nomeadamente na construção de nanopartículas e outros dispositivos para sistemas de libertação controlada, na construção de membranas e no processamento de *scaffolds* (Agnihotri e col., 2004, Sinha e col., 2004, Prabakaran e Mano, 2005a, Couto e col., 2009).

O quitosano apresenta atividade antimicrobiana, uma propriedade útil na construção de filmes antimicrobianos biocompatíveis e não-tóxicos (Kim e col., 2008a, Venkatesan e Kim, 2010). Apresenta também atividade antitumoral, anti-inflamatória e apresenta características semelhantes às encontradas na matriz extracelular. Todas estas propriedades biológicas fazem do quitosano um excelente biomaterial para a construção de dispositivos de carga para sistemas de libertação controlada. Tal como o alginato, o quitosano também é utilizado como excipiente de medicamentos (Ilium, 1998) e como matéria-prima na construção de microcápsulas para a libertação controlada de biomoléculas (Rinaudo, 2006). Nos sistemas de libertação controlada de biomoléculas as interações iónicas são fundamentais para a estabilização, proteção e/ou

retardação do efeito de uma determinada biomolécula. Isto significa que, se um fármaco é de natureza catiónica, polímeros com natureza aniónica, como é o caso do alginato, serão usados como excipiente, e vice-versa. O quitosano é utilizado na construção de partículas, cápsulas, nanotubos, membranas, hidrogéis e estruturas tridimensionais implantáveis, sendo estes últimos muito utilizados na medicina regenerativa e na engenharia de tecido. A libertação do fármaco a partir de dispositivos à base de quitosano depende da morfologia, tamanho e densidade do dispositivo, do grau de reticulação, assim como as propriedades físico-químicas do agente bioativo. A libertação também vai depender das condições de pH e também pela presença ou não de enzimas no meio. A libertação de agentes bioativos ocorre por diferentes mecanismos: libertação a partir da superfície de partículas; difusão do agente encapsulado e por erosão do polímero (Agnihotri e col., 2004, Bhise e col., 2008). Outro mecanismo de libertação controlada de dispositivos à base de quitosano é a libertação por degradação enzimática, sendo a lisozima uma das enzimas mais conhecida pela sua degradação (Varum e col., 1997, Azevedo e Reis, 2005). É possível também aumentar a capacidade de ligação a fármacos pouco solúveis em água através de modificações químicas do quitosano (Prabaharan e col., 2007, Prabaharan e Mano, 2006, Prabaharan e Mano, 2005b).

A construção de dispositivos de libertação controlada aproveitando a particularidade do quitosano formar complexos com outros materiais, pode fornecer uma maior estabilização do fármaco e também aumentar a quantidade de encapsulamento. Esses materiais polianiónicos incluem o alginato, o ácido hialurónico, a carragenina, os poliacrilatos e a pectina. Estes materiais, em conjunto com o quitosano, formam complexos estáveis de alta densidade capazes de fornecer estabilidade e proteção ao agente bioativo (Agnihotri e col., 2004, Tapia e col., 2005).

A utilização do quitosano como biomaterial em sistemas de libertação controlada e em estruturas implantáveis biodegradáveis é uma das abordagens mais estudadas na biomedicina. Um novo tipo de partículas esféricas injetáveis de quitosano foi obtido utilizando superfícies superhidrofóbicas (Costa e col., 2014), uma técnica que permite o carregamento de fármacos em estruturas esféricas com uma eficiência de encapsulamento perto dos 100% (Song e col., 2010). Existem estudos sobre a degradação do quitosano, nomeadamente em matrizes

construídas por moldagem por compressão utilizando quitosano com diferentes graus de desacetilação, indicaram que o grau de desacetilação tem influência na velocidade de degradação: quanto menor for o grau de desacetilação, maior é a velocidade de degradação do quitosano (Ren e col., 2005). Os índices de degradação foram medidos pela perda de massa das estruturas, pela absorção de água e pela quantidade de açúcares reduzidos no meio. Desta forma, é possível obter um maior controlo sobre a velocidade de degradação, pois esta depende em grande parte pelo grau de desacetilação e pelo peso molecular do quitosano. Assim, o grau de desacetilação pode ser determinante na escolha do tipo de quitosano para a construção de veículos de libertação controlada de biomoléculas e dispositivos implantáveis.

À semelhança do alginato, também o quitosano pode ser combinado com outros biomateriais inteligentes para construir dispositivos de libertação controlada. Um dos mecanismos mais utilizados é a libertação controlada por variações de temperatura (Costa e col., 2013). Para isso, são necessários biomateriais termossensíveis. Um novo tipo de microcápsulas foi construído a partir da combinação entre o quitosano e polímeros tipo-elastina, um polipéptido recombinante com a capacidade de resposta à variação da temperatura. As microcápsulas foram construídas por LbL, tomando partido da carga positiva do quitosano e da carga negativa do polímero tipo-elastina. Utilizando a albumina do soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) como droga-modelo, foram realizados ensaios de libertação a 25 e 37 °C. Os resultados indicaram uma maior retenção de BSA à temperatura fisiológica e uma maior libertação a 25°C. Estes resultados não só comprovaram a sensibilidade térmica destas microcápsulas mas também a capacidade do quitosano de se adaptar na forma de revestimento nanoestruturado com biomateriais com distintas respostas inteligentes. Estudos com células também revelaram uma baixa citotoxicidade deste tipo de estruturas (Costa e col., 2013).

A modificação química do quitosano também pode ser uma boa estratégia, de forma a aumentar a eficácia de libertação e beneficiar outras propriedades. O quitosano N,O-carboximetilo (NOCC, ou quitosano carboximetilado) é solúvel em água e, como conserva alguns resíduos de amina, apresenta carácter catiónico em condições ácidas, garantindo a sua sensibilidade ao pH (Chen e col., 2004). Um hidrogel

à base de quitosano carboximetilado e PNIPAAm telequérico num grupo amina (PNIPAAm-NH₂) foi apresentado como dispositivo para a libertação controlada de biomoléculas. Ensaio de libertação utilizando o cetoprofeno demonstraram a sensibilidade às variações de temperatura e pH do hidrogel, dos quais foi possível obter diferentes perfis de libertação sustentada a diferentes temperaturas e diferentes valores de pH. Este tipo de hidrogéis inteligentes demonstraram um grande potencial para a sua utilização como dispositivos para a libertação controlada de fármacos (Prabaharan e Mano, 2007). Também, a introdução de grupos tióis, aumenta a solubilidade do quitosano em água, mantendo a dependência ao pH das partículas para libertação controlada (Jayakumar e col., 2007).

Hidrogéis à base de quitosano obtidos por reticulação podem ter a capacidade de promover uma libertação sustentada e localizada de diferentes agentes terapêuticos (Bhattarai e col., 2010). Outros estudos utilizam hidrogéis termosensíveis de quitosano de administração nasal para a libertação controlada de biomoléculas (Wu e col., 2007). Neste caso, os hidrogéis são construídos pela junção do cloreto de N-[(2-hidroxi-propil-3-trimetil de amónia)] quitosano (HTCC do inglês *N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chitosan chloride*) com PEG e alfa-beta-glicerofosfato. Estes hidrogéis apresentam sensibilidade ao pH e têm a particularidade de estarem no estado líquido à temperatura ambiente e apresentarem uma forma mais rígida a 37 °C. A adição do alfa-beta-glicerofosfato, uma base fraca, como agente gelificante vai neutralizar a solução ácida. A pH neutro o grupo NH₂ do HTCC está desprotonado, enquanto as aminas quaternárias estão protonadas. A repulsão existente entre os dois grupos impedem as cadeias de HTCC de se agregarem novamente. O glicerofosfato também promove a hidratação do HTCC; por isso o HTCC encontra-se em solução a baixas temperaturas. O aumento da temperatura pode quebrar as pontes de hidrogénio entre o HTCC e a água. A água libertada provoca um aumento da entropia do sistema, promovendo a agregação das cadeias hidrofóbicas, dando origem a um processo de gelificação (Wu e col., 2006). Desta forma, estes hidrogéis podem ser utilizados como dispositivos inteligentes para a libertação controlada de agentes bioativos de administração nasal, visto poderem ser administrados em gotas ou em *spray*. Uma vez aplicada, a solução passa a estar à temperatura fisiológica, transformando-se num hidrogel viscoso e que pode ser absorvido pelas mucosas. Devido a sua facilidade

de produção e administração, esta nova formulação foi testada como dispositivo de carga para a libertação controlada de insulina. Ensaios de libertação de insulina em ratos indicaram um aumento da absorção nas cavidades nasais e uma diminuição de glucose no sangue, sem qualquer evidência de citotoxicidade, mostrando o grande potencial destes hidrogéis como dispositivo de carga para libertação controlada de agentes bioativos, principalmente biomoléculas hidrofílicas (Wu e col., 2007). Estes tipos de hidrogéis continuam a ser estudados como dispositivo de carga de biomoléculas para a libertação controlada. A administração nasal é muito favorável para o paciente, pois não causa desconforto e dor. Desta forma, estão a ser testados diferentes fármacos, incluindo a insulina, com o objetivo de utilizar este tipo de formulação de modo a obter uma libertação sustentada e uma administração fiável e do agrado do paciente (Nazar e col., 2011). O facto deste tipo de hidrogel estar na sua forma líquida à temperatura ambiente torna-o também um potencial dispositivo de administração parenteral (Tahrir e col., 2014).

O quitosano como polímero de natureza catiónica pode complexar com ácidos nucleicos e formar complexos com aplicabilidade na terapia génica. Existem diferentes estudos que utilizam este tipo de complexos na transfeção de genes (Roy e col., 1999, Borchard, 2001, Sato e col., 2001). A formação do complexo entre o polímero e o ácido nucleico depende de muitos fatores, como o grau de desacetilação e o peso molecular do quitosano, assim como o pH do meio. Todos estes fatores podem ter um efeito determinante na eficácia da transfeção (Saranya e col., 2011). As cargas positivas do polímero também interagem com as cargas negativas dos peptidoglicanos presentes na membrana celular. Esta característica pode facilitar a entrada do complexo na célula por vias endocíticas (De Smedt e col., 2000, Cho e col., 2003). A quantidade de material genético disponível para interagir com o quitosano também é muito importante: um rácio não apropriado pode levar à dissociação do complexo ou à ausência de complexação em extensão suficiente (Saranya e col., 2011). Foi reportada a utilização de derivados de quitosano para ultrapassar algumas dessas limitações. A alteração química do quitosano pode aumentar a afinidade com o ADN, dando origem a um complexo mais estável, o que pode significar num aumento do índice de transfeção (Kean e col., 2005). As alterações podem também aumentar a solubilidade e assim o quitosano pode oferecer uma maior proteção ao ADN da ação de

enzimas que degradam o ADN, as ADNaes. Estas modificações do quitosano abriram um novo leque de possibilidades na construção de dispositivos de carga para a libertação controlada intracelular de material genético, com grande aplicabilidade no tratamento de diferentes doenças genéticas (Saranya e col., 2011).

2.3 Carragenina

A carragenina (CG) é um polissacarídeo sulfatado presente nas algas vermelhas, composto por uma sequência linear de resíduos ligados alternadamente em conformação (A-B)_n. As unidades são constituídas por resíduos de galactoses sulfatados, ou não, ligados na conformação α -1,3 (unidade A) e resíduos ligados na conformação β -1,4 (unidade B) (Figura 2). A unidade A encontra-se sempre na conformação D-, enquanto o resíduo da unidade B pode encontrar-se na configuração D- ou L-. O grupo sulfatado confere-lhe carga negativa, pelo que são bons candidatos a polianióes (Rinaudo, 2008). As carrageninas são classificadas segundo o grau de sulfatação: podem ser kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ), para, respetivamente, um, dois ou três grupos de sulfato. O processo de extração é bastante simples. Consiste na imersão da matéria-prima numa solução alcalina até se formar uma espécie de gel. Segue-se um passo de extração com água quente e, dependendo do tipo de carragenina e do grau de purificação pretendido, podem-se adicionar mais passos de purificação, como por exemplo diálise, e repetir os passos de precipitação (Rinaudo, 2008, Silva e col., 2012b). Todos os grupos de carragenina são solúveis em água, e o número de grupos sulfatados influencia a capacidade de gelificação. Os tipos κ e ι formam géis mais facilmente do que a carragenina λ devido ao baixo número de grupos sulfatados (Silva e col., 2012b). Esta característica tem vindo a ser aproveitada em muitas áreas, como nas indústrias alimentar (que utiliza a carragenina como agente emulsificante e estabilizador), cosmética e também na farmacêutica (Li e col., 2014). Ao contrário do que acontece com outros biomateriais de origem marinha, a utilização da carragenina como excipiente na indústria farmacêutica não é comum, pelo que não existem muitos estudos sobre as suas aplicações, características e funções como excipiente. Vários artigos de revisão debruçam-se sobre as aplicações biomédicas da carragenina principalmente em sistemas de libertação controlada (Li e col., 2014, Campo e col., 2009).

Para além das aplicações nas indústrias alimentar e farmacêutica, a carragenina apresenta também variadas aplicações biomédicas devido às suas propriedades anticoagulantes (Silva e col., 2010), anticancerígenas (Zhou e col., 2004), antihiperlipidémicas, além de apresentar atividades imunomodulatória e antioxidante. A carragenina apresenta também atividade protetora contra bactérias, fungos e alguns vírus (Campo e col., 2009). Devido à sua atividade antiviral, a carragenina tem sido sugerida em possíveis tratamentos de doenças respiratórias, como a famosa gripe das aves, e também está a ser testada para o tratamento de outros vírus, como o vírus do dengue, da hepatite A, do VIH (Schaeffer e Krylov, 2000) e do herpes (Carlucci e col., 1999). Estudos revelam que a carragenina, e seus derivados de degradação, apresentam diferentes níveis de toxicidade, mas nenhum coloca em risco a saúde do paciente, fazendo da carragenina um composto relativamente não-tóxico e não-irritante (Campo e col., 2009, Prajapati e col., 2014).

A aplicação biomédica mais importante da carragenina é a sua utilização na construção de veículos de carga para sistemas de libertação controlada de agentes bioativos, assim como no encapsulamento de vários tipos de células em tratamentos de medicina regenerativa e na regeneração de cartilagem (Silva e col., 2012b, Popa e col., 2013). A utilização de hidrogéis de carragenina como estabilizadores e veículos de carga para a libertação de biomoléculas também pode ser uma boa estratégia. Hidrogéis a partir de κ -carragenina foram desenvolvidos para o encapsulamento de diferentes tipo de células humanas, algumas estaminais, concluído que este tipo de estruturas é um suporte adequado para a cultura deste tipo de linhas celulares e para a diferenciação condrogénica (Popa e col., 2014). Este sistema revelou ter potencial na regeneração de cartilagem e no desenvolvimento de novos tratamentos, uma vez que estes hidrogéis podem ser facilmente injetáveis *in situ*. (Rocha e col., 2011, Popa e col., 2014). Hidrogéis à partir de carragenina e outro material de origem marinho também revelaram-se como bons dispositivos para o encapsulamento de células (Luna e col., 2010, Gasperini e col., 2014). Foi também apresentado um novo método de construção de hidrogéis esféricos e fibrilares de carragenina-alginato para o encapsulamento de condrócitos; estes dispositivos apresentaram, tanto na sua forma esférica como em fibra, serem um bom veículo de carga para o encapsulamento de células para aplicações na medicina regenerativa (Popa e col., 2011).

A carragenina pode ser utilizada como excipiente no fabrico de dispositivos de administração oral. Isto deve-se às suas propriedades físico-químicas, como a sua solubilidade em água, e a capacidade de formar géis. A capacidade de carga da carragenina depende muito do seu tipo, assim como o tipo de gel que se forma, o que afetará as suas propriedades mecânicas e a sua solubilidade. Estes fatores podem ter influência na libertação do fármaco prolongando ou acelerando a sua libertação (Bornhöft e col., 2005). Para se obter um maior controlo do perfil de libertação do fármaco - independentemente de outras condicionantes, como o tipo de carragenina e as variações de pH - por vezes é necessário utilizar outros polímeros com o objetivo de obter um maior controlo na libertação. A adição de polímeros, como o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), um polímero semissintético sensível à temperatura muito utilizado na indústria farmacêutica, pode resolver problemas relacionados com a erosão da carragenina influenciada pelo pH. Por outro lado, a utilização de polímeros carregados positivamente, como o quitosano, pode dar origem a complexos polieletrólíticos muito estáveis capazes de fornecer uma maior proteção do fármaco e promover uma libertação prolongada, uma vez que estes complexos apresentam uma menor sensibilidade às variações de pH (Bonferoni e col., 1998). A carragenina pode ser utilizada, em conjunto com o alginato, para formar hidrogéis sensíveis ao pH. Desta forma, é possível obter, não só uma libertação controlada, mas também um maior controlo no processo da incorporação do agente terapêutico (Mohamadnia e col., 2007). Aproveitando as propriedades aniónicas da carragenina e a sua capacidade de interagir com fármacos carregados positivamente, é possível obter dispositivos com uma libertação prolongada, ou, em certos casos, uma velocidade de libertação constante (Li e col., 2014). Mostrou-se também que este tipo de polissacarídeos têm a propensão para se ligar a proteínas bioativas, tal como fatores de crescimento, estendendo assim a sua aplicabilidade em dispositivos para terapias avançadas (Oliveira e col., 2015, Yan e col., 2015).

A carragenina é também utilizada na construção de estruturas de multicamadas (Oliveira e col., 2013), microcápsulas e micro/nanopartículas. Estas estruturas são principalmente construídas baseadas nas interações eletrostáticas entre a carragenina e um polícatião. Por exemplo, nanopartículas de quitosano-carragenina foram desenvolvidas para a libertação controlada de biomoléculas, através de um método de

construção simples que evita o uso de solventes orgânicos (Grenha e col., 2010). As nanopartículas apresentavam um tamanho entre os 350 e 650 nm. Utilizando ovalbumina como proteína modelo, fizeram-se ensaios de libertação *in vitro*, demonstrando uma libertação prolongada ao longo do tempo, nomeadamente nos primeiros 20 dias. Este é um parâmetro muito importante, pois possibilita a diminuição da dose administrada e também não exige administrações sucessivas. Os testes de citotoxicidade demonstraram que estas estruturas em concentrações consideráveis não apresentaram nenhum tipo de citotoxicidade. O facto de terem apresentado bons resultados utilizando proteínas modelo é um bom indicativo que estas estruturas podem ser viáveis para o encapsulamento de outras proteínas com fins terapêuticos (Grenha e col., 2010).

Existe outro biomaterial de origem marinha com estrutura similar à carragenina, porém com diferentes aplicações biomédicas, o agar. O agar é um polissacarídeo presente na parede celular das algas vermelhas. A sua estrutura é similar à carragenina, com resíduos ligados alternadamente na conformação (A-B)_n. As unidades são constituídas por resíduos de galactoses ligados α -1,3 (unidade A) com resíduos β -1,4 (unidade B). A principal diferença em relação à carragenina é que a unidade A está sempre na conformação D- enquanto o resíduo da unidade B só pode estar na configuração L-. Ao contrário da carragenina, o agar não está classificado segundo o grau de sulfatação, uma vez que o tipo de agar mais conhecido é um tipo neutro sem nenhum grupo sulfatado. O agar é muito utilizado na indústria alimentar e também na microbiologia na forma de gel como meio de cultura. As aplicações biomédicas do agar associadas à libertação de agentes bioativos são geralmente na construção de hidrogéis, aproveitando as suas capacidades de gelificação, a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Hoare e Kohane, 2008, Rossi e col., 2011).

2.4 Ácido hialurónico

O ácido hialurónico é um polissacarídeo linear com um elevado peso molecular. É constituído por uma cadeia alternada de duas subunidades: a primeira de resíduos de D-ácido glucurónico ligados entre si na conformação α -1,4, e a segunda de N-acetil-D-glucosamina ligados entre si na conformação β -1,3, sendo que as suas subunidades estão ligadas entre si na conformação α - e β -1,3 (Burdick e Prestwich, 2011) (Figura 2). O ácido

hialurónico é um dos maiores componentes da matriz extracelular e está presente no líquido sinovial, no humor vítreo e no tecido cartilaginoso. Devido ao seu elevado peso molecular e a sua viscoelasticidade fazem do ácido hialurónico um composto importante para o desempenho de funções biológicas importantes e também como um excelente material para diferentes aplicações biomédicas (Kogan e col., 2007). O ácido hialurónico desempenha diferentes funções biológicas, nomeadamente ao nível da regeneração de tecidos, da proliferação, diferenciação e migração celular. Por causa da sua presença no líquido sinovial nas junções das articulações, o ácido hialurónico pode ser utilizado como marcador biológico para diagnóstico de doenças relacionadas com a artrite reumatóide (Lee e col., 2008). Este biomaterial também tem sido proposto em várias aplicações biomédicas, nomeadamente na engenharia de tecidos e na construção de estruturas para tratamentos de cicatrização (Chen e Abatangelo, 1999). Pode ainda ser utilizado como suplemento em pacientes com artrite (Kogan e col., 2007). Hoje em dia, a sua produção é feita em grande escala por fermentação bacteriana, algumas das quais de origem marinha (Kim e col., 2006). A produção por fermentação pode evitar contaminações patogénicas relacionadas com a extração a partir de animais mamíferos, como por exemplo a encefalopatia espongiiforme bovina (Vázquez e col., 2013). Contudo, o ácido hialurónico pode também ser extraído diretamente a partir de fontes animais marinhas, tais como, tecido cartilaginoso e também a partir do humor vítreo de várias espécies de peixe (Murado e col., 2012). O ácido hialurónico é biodegradável pela ação de enzimas como a hialuronidase (Zhong e col., 1994). O ácido hialurónico está presente em vários fluidos biológicos sendo indicativo da sua facilidade de circulação.

O ácido hialurónico apresenta importantes propriedades biológicas como a adesão a diferentes tecidos e elevada biocompatibilidade. A sua capacidade de interagir com proteínas pode ser utilizada como uma ferramenta de diagnóstico, em especial devido à existência de recetores membranares específicos para o ácido hialurónico. É o caso do recetor CD44 cuja sua elevada expressão pode indicar um aumento da proliferação celular. O aumento do nível de expressão deste recetor pode ser um excelente marcador para o diagnóstico precoce de cancro (Kramer e col., 2011). O ácido hialurónico tem a capacidade de formar géis, capazes de incorporar biomoléculas. Todas estas características fazem do ácido hialurónico um

excelente biomaterial para a construção de veículos de carga de agentes bioativos para liberação controlada (Luo e col., 2000). Os dispositivos de carga construídos a partir do ácido hialurônico permitem a incorporação de fármacos, proteínas e ácidos nucleicos. Estas estruturas podem ser diferentes, dependendo da sua aplicação biomédica, podendo ser obtidas por metodologias distintas de construção. É possível obter nanopartículas com base na interação do ácido hialurônico com metais como o ouro, as quais são muito estudadas como marcadores para diagnóstico de doenças, como a artrite reumatóide e o cancro, devido à capacidade destas de emitirem fluorescência (Mohammad e Xuefei, 2011).

Existem também nanopartículas de ácido hialurônico complexado com quitosano. Estas nanopartículas têm sido utilizadas como dispositivos para a liberação controlada de material genético, no desenvolvimento de novos tratamentos baseados em terapia gênica. Alguns estudos apresentaram uma nova abordagem para o tratamento de doenças do foro ocular (de la Fuente e col., 2008, Contreras-Ruiz e col., 2011). Um deles consiste na construção de nanopartículas de ácido hialurônico e quitosano, considerando as interações eletrostáticas entre ambos, com o objetivo de proceder a uma liberação controlada de genes na córnea e na conjuntiva ocular. Os resultados indicaram uma grande viabilidade destas nanopartículas, não só pelas suas dimensões (100-230 nm), mas também porque foi possível observar a internalização destas partículas através do processo endocítico mediado por recetores membranares. Esta internalização permitiu atingir um índice de transfeção de 15%, o que revela o grande potencial biomédico destas nanopartículas como dispositivo de entrega de genes no tratamento de doenças ao nível do tecido da conjuntiva ocular (de la Fuente e col., 2008).

Existem outros tipos de estruturas obtidas a partir da combinação do ácido hialurônico e do quitosano, ou outro polímero de natureza catiónica. As micropartículas, microesferas e microcápsulas construídas à base de ácido hialurônico têm a capacidade de incorporar uma vasta variedade de agentes bioativos, as quais podem ser construídas por diferentes metodologias, entre elas o LbL (Szarpak e col., 2010) e o *spray-drying* (Iskandar e col., 2009). Entre as diversas formas de fabricar microesferas, um núcleo pode ser construído pela reticulação do quitosano, dando origem a microesferas onde vai ocorrer a deposição das multicamadas

alternadas contendo ácido hialurónico (Grech e col., 2008). Este tipo de estruturas possui potencial em sistemas de libertação controlada de agentes bioativos, por exemplo, o sulfato de gentamicina. Os resultados de libertação *in vitro* indicaram uma libertação sustentável a partir deste tipo de microesferas quando comparadas com a libertação do fármaco dos núcleos não-recobertos (Grech e col., 2008). Revestimentos obtidos por LbL podem possuir propriedade adesivas por modificação química do ácido hialurónico, utilizando, por exemplo, dopamina (Neto e col., 2014).

O ácido hialurónico pode ser utilizado no revestimento de lipossomas. O lipossomas são sensíveis ao pH, e têm vindo a ser utilizados como agentes para a libertação controlada de agentes bioativos em tratamentos de cancro e outras doenças (Simões e col., 2004). Uma abordagem na utilização destas estruturas tirou partido de lipossomas sensíveis ao pH contendo pequenos péptidos, com a capacidade de serem internalizados por células (Jiang e col., 2012). Um fármaco com atividade antitumoral foi incorporado nesses lipossomas, seguindo-se o revestimento destes por ácido hialurónico. O revestimento dos lipossomas promove uma proteção contra ataques por parte de proteínas presentes na corrente sanguínea que podem degradar o lipossoma. Ultrapassando essa barreira, as partículas entram na matriz extracelular do tumor, onde a hialuronidase degrada a camada externa de ácido hialurónico. Deste modo, o lipossoma fica exposto às variações do pH existentes no meio tumoral, permitindo uma maior internalização celular por endocitose, levando à libertação do fármaco no citoplasma. Utilizando o paclitacel como droga modelo os ensaios realizados *in vivo* indicaram uma grande atividade antitumoral por parte destas partículas demonstrando a grande aplicabilidade destes dispositivos em tratamentos de cancro (Jiang e col., 2012).

O ácido hialurónico pode ser utilizado na construção de hidrogéis. Um hidrogel sensível a variações de pH e temperatura foi desenvolvido para aplicações de libertação controlada de agentes bioativos (Santos e col., 2010). Os hidrogéis foram construídos a partir do ácido hialurónico e do polímero sensível à temperatura PNIPAAm. Os hidrogéis foram caracterizados para testar a sua sensibilidade às variações de pH e temperatura. Utilizando gentamicina como droga modelo, foram estudados os perfis de libertação a 37 °C e a pH 7,4. Os resultados mostraram uma libertação inicial a rondar os 25%, seguida de uma libertação sustentável

durante as 20 horas seguintes. Os resultados também demonstraram que a velocidade de libertação aumenta com o aumento do rácio de ácido hialurónico no hidrogel. Estas estruturas apresentaram sensibilidade às variações de temperatura e pH, demonstrando o seu potencial na utilização como dispositivos de carga de agentes bioativos em sistemas inteligentes de libertação controlada (Santos e col., 2010).

2.5 Sulfato de condroitina

O sulfato de condroitina é um polissacarídeo constituído por uma cadeia simples de D-galactosamina e D-ácido glucurónico (Figura 2). O sulfato de condroitina é normalmente extraído a partir de cartilagens de animais terrestres como o gado bovino e porcino e também de alguns animais marinhos, como a baleia e o tubarão, cuja extração, devido a problemas de ordem ecológica, é agora bastante limitada. Porém, existem outras fontes deste material, como a raia, o salmão, o pepino-do-mar, os cnidários e os moluscos, sendo estas espécies a maior fonte de sulfato de condroitina não-mamífera (Silva e col., 2012a). O sulfato de condroitina tem propriedades anticoagulantes e tem sido sugerido como substituto da heparina, um dos mais conhecidos fármacos anticoagulantes (Teien e col., 1976, Lindahl e col., 1994), como princípio ativo na construção de fármacos com propriedades anticoagulantes e como suplemento na prevenção da artrite (Clegg e col., 2006). O sulfato de condroitina pode ser utilizado na forma de hidrogel como agente de integração na regeneração de tecido cartilaginoso (Wang e col., 2007).

Porém, o sulfato de condroitina é também um material adequado para construir dispositivos de carga em sistemas de libertação controlada de agentes bioativos. Nanopartículas biocompatíveis e não-citotóxicas foram obtidas a partir da interação eletrostática entre o sulfato de condroitina e o quitosano (Santo e col., 2012). Os resultados indicaram uma grande capacidade de retenção de proteína e fatores de crescimento. Ensaio de libertação demonstraram uma libertação sustentada do fármaco na ordem dos 65% nos primeiros 30 dias. Estudos *in vitro* realizados em células estaminais humanas do adipócito mostraram a capacidade destas nanopartículas entrarem nas células, sendo a internalização dependente da concentração de partículas no meio e do tempo de cultura. Estes resultados revelaram que estas nanopartículas não só podem funcionar

como veículos de carga para a libertação controlada de proteínas, fatores de crescimento e outras biomoléculas por difusão, mas também possuem a capacidade de internalização celular (Santo e col., 2012).

Um estudo recente apresentou um novo tipo de estruturas porosas de forma tubular construídas a partir da hidroxiapatite e sulfato de condroitina, para libertação de fármacos anticancerígenos (Guo e col., 2014). O fármaco utilizado foi o hidrocloreto de doxorubicina. Estudos de encapsulamento demonstraram uma elevada facilidade de encapsular o agente bioativo neste dispositivo devido à sua geometria e pela presença de poros. Ensaios de libertação revelaram um perfil de libertação controlada dependente do pH. Verificou-se uma libertação mais rápida na fase inicial seguida de uma libertação sustentada ao longo de 70 horas. Estes resultados revelaram o potencial da utilização destas estruturas como dispositivos de libertação controlada de fármacos para tratamentos de quimioterapia, não só devido pela sua libertação dependente do pH, mas também por apresentar uma libertação sustentada num longo período de tempo (Guo e col., 2014).

As interações eletrostáticas entre diferentes materiais, assim como as suas propriedades químicas, podem ser utilizadas para a construção de dispositivos com a capacidade de incorporar diferentes agentes bioativos para libertação controlada. Esses materiais podem ser de origem sintética ou de origem natural. Apesar das inúmeras vantagens destes últimos, os primeiros ainda são frequentemente utilizados na indústria farmacêutica. Um desses materiais é o PEG, polímero de origem sintética com características neutras. Foi proposta uma nova abordagem na construção de nanocomplexos compostos por copolímeros em bloco constituídos por PEG ligado a diferentes glicosaminoglicanos de distintos pesos moleculares e com diferentes números de grupos sulfatados (Novoa-Carballal e col., 2014). Estas estruturas, devido a suas características aniónicas, permitem o encapsulamento de polipéptidos carregados positivamente, como fatores de crescimento e outras citocinas. Os seus resultados demonstraram que é possível encapsular polipéptidos carregados positivamente, como a poli-(L-lisina) (PLL), através de complexação, obtendo nanopartículas de pequenas dimensões. O tamanho pode variar dependendo do peso molecular e do número de grupos sulfatados do glicosaminoglicano utilizado. A possibilidade de utilizar diferentes glicosaminoglicanos, incluindo o ácido hialurónico e o sulfato de condroitina, é um sinal do

grande potencial da utilização deste tipo de abordagem para a construção de dispositivo de carga para libertação controlada de polipéptidos catiónicos.

2.6 Fucoïdano

O fucoïdano é um polissacarídeo sulfatado presente em várias espécies de algas castanhas. É constituído por cadeias de 1-fucose sulfatadas ligadas na conformação α -1,3, embora seja possível que a ligação glicosídica se encontre na conformação α -1,4 (Figura 2). A sua estrutura e composição depende muito da fonte de extração. A extração pode ser processada por precipitação utilizando sais ou solventes orgânicos, e a sua purificação por cromatografia (Li e col., 2008).

Hoje em dia são conhecidas várias características sobre a sua bioatividade. Foi reportado que o fucoïdano apresenta uma atividade antitumoral dependente do grau de sulfatação e inibe a proliferação celular e o crescimento de tumores (Ermakova e col., 2011, Anastyuk e col., 2012). No entanto, foi também reportado que o fucoïdano não é só tóxico para as células tumorais mas também em células normais, pelo que dificulta a sua utilização em terapias contra o cancro. A sua atividade antiproliferativa também lhe concede propriedades anti-inflamatórias. Todas estas características fazem deste material um ótimo material para a indústria farmacêutica, aproveitando principalmente as suas propriedades anticoagulantes e antivirais (Kim e col., 2008b, Sezer e Cevher, 2011).

O fucoïdano pode ser processado sob a forma de microesferas obtidas pela reticulação de fucoïdano e quitosano, denominadas fucoesferas. (Sezer e Akbuga, 2006). Existem estudos que reportam a atividade destas fucoesferas na regeneração de tecido em tratamentos de queimaduras. As partículas apresentavam um tamanho que variava entre os 367 e os 1017 nm e ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma diminuição no tempo de tratamento normal de queimaduras devido ao aumento na regeneração e cicatrização do tecido epitelial, demonstrando o potencial destas estruturas no tratamento de queimaduras na derme (Sezer e col., 2008). Aproveitado ainda a grande bioatividade do fucoïdano, a utilização de complexos de fucoïdano e quitosano expande-se a outras aéreas, tal como na construção de nanopartículas com função anticoagulante (Nakamura e col., 2008).

Existem várias formas de processar o fucoídano em dispositivos de carga. Alguns destes dispositivos são construídos usando LbL, nomeadamente filmes de fucoídano-insulina sensíveis ao pH para a libertação controlada de insulina (Sato e col., 2012). Outro estudo reporta a construção de nanopartículas como dispositivos de carga de fucoídano e quitosano processados por LbL (Pinheiro e col., 2015). Neste estudo utilizaram-se nanopartículas de poliestireno com um diâmetro aproximado de 100 nm. Após a construção do revestimento, o núcleo da cápsula de poliestireno foi removido, sendo deste modo possível incorporar dentro da cápsula inúmeros agentes bioativos. O PLL foi o agente catiónico bioativo escolhido para o estudo de incorporação e libertação. Os resultados demonstraram que a libertação era dependente do pH e que a libertação se dava através de um mecanismo de difusão. Estas cápsulas revelaram uma elevada viabilidade como dispositivo de carga para a libertação de biomoléculas, nomeadamente para compostos solúveis em água, aumentando assim a aplicabilidade do fucoídano na indústria farmacêutica.

Outro estudo reportou o desenvolvimento de nanopartículas de quitosano e fucoídano sensíveis ao pH para administração oral (Huang e Lam, 2011). Estas partículas obtidas por gelificação iónica deram origem a partículas com um tamanho aproximado de 173 nm. A incorporação do agente bioativo pode ser realizada no momento da gelificação. Neste estudo a biomolécula incorporada foi a curcumina, composto bioativo com potencial anticancerígeno. As partículas compostas por curcumina/quitosano/fucoídano apresentavam diferentes tamanhos, dependendo do pH. Os ensaios de libertação *in vitro* mostraram ter sido possível diminuir a libertação para valores de pH baixos, similares às condições presentes no sistema gástrico, e verificou-se um aumento da velocidade de libertação para pH igual a 7. Estes resultados indicam uma sensibilidade destas partículas às variações de pH e também a possibilidade da utilização destas partículas como dispositivo de carga para administração oral.

2.7 Ulvano

O ulvano é um polissacarídeo sulfatado extraído da alga verde *Ulva*. É composto por resíduos de glucose, ramnose, xilose, ácido glucurónico e ácido idurónico, ligados na conformação α - e β -1,4 (Figura 2). Devido à variedade de polissacarídeos na sua composição, o ulvano pode

apresentar variações na distribuição de carga e na densidade eletrónica, bem como variações no peso molecular. Por ser constituído por vários tipos de açúcares raros, o ulvano é uma fonte para a obtenção desses açúcares sem recorrer à síntese química. O processo de extração do ulvano é bastante simples: consiste na adição de solventes orgânicos sobre a matéria-prima, seguido de passos sucessivos de lavagem com água quente, filtrações e centrifugações (Lahaye e Robic, 2007). O ulvano apresenta também atividade biológica de relevo: é considerado um agente antiviral, antioxidante, antitumoral, anticoagulante, anti-hiperlipidémico e estimulador do sistema imunitário. O ulvano apresenta baixos níveis de citotoxicidade numa grande gama de concentrações (Alves e col., 2013a). Todas estas propriedades fazem do ulvano um dos materiais com maior potencial para o desenvolvimento de novas aplicações biomédicas, como por exemplo, a sua utilização como princípio ativo, aproveitando as suas propriedades antivirais, antioxidantes, anticoagulantes e também em tratamentos contra o cancro devido a sua atividade antiproliferativa. Devido à sua capacidade de complexar com iões metálicos, o ulvano pode ser utilizado como agente quelante no tratamento de envenenamento por metais pesados (Costa e col., 2012, Alves e col., 2013b). Outra aplicação biomédica do ulvano é a construção de dispositivos para aplicações na medicina regenerativa e na engenharia de tecidos, como, por exemplo, na forma de nanofibras e membranas para tratamentos de renegação de tecidos, principalmente na cicatrização (Dash e col., 2014).

O ulvano pode ser modificado quimicamente com o objetivo de obter hidrogéis termoestáveis. A adição de grupos de metacrilato, e através de uma fotopolimerização por radiação ultravioleta, podem-se obter hidrogéis à base de ulvano com aplicabilidade biomédica (Morelli e Chiellini, 2010). O ulvano é também utilizado na construção de micropartículas tirando partido das interações electroestáticas com polímeros de natureza catiónica (Costa e col., 2012). Para além das aplicações biomédicas, o ulvano é também utilizado nas indústrias alimentar e cosmética.

Estruturas bidimensionais para libertação de fármacos foram construídas a partir da reticulação química do ulvano, nomeadamente para o tratamento de cicatrização e regeneração de tecidos (Alves e col., 2012b). A droga modelo utilizada para os ensaios de libertação foi a dexametasona. Os resultados mostraram uma libertação rápida na ordem dos 49% nas

primeiras horas, seguida de uma libertação sustentada até 14 dias. Estes resultados nos ensaios de libertação controlada, assim como as próprias propriedades da membrana, demonstraram que este tipo de estruturas podem ter grande aplicabilidade quando associadas à construção de membranas biodegradáveis para regeneração de tecidos, assim como na aceleração do processo de cicatrização.

Também é possível obter estruturas tridimensionais, como, por exemplo, micropartículas de ulvano. Neste contexto, apresentaram um novo tipo de partículas foi produzido a partir da interação com o quitosano, para o encapsulamento de dexametasona (Alves e col., 2012a). Estas partículas foram utilizadas na construção de estruturas tridimensionais de poli-(D,L-ácido láctico), com a finalidade de regenerar tecido ósseo. Os resultados de libertação controlada *in vitro* demonstraram que a utilização dessas micropartículas pode ser largamente vantajosa, na medida em que é possível obter um sistema de libertação controlada e localizada, confirmando a elevada aplicabilidade deste tipo de sistemas em estratégias de medicina regenerativa e também como biomaterial com potencial biomédico.

2.8 Outros polissacarídeos sulfatados

Existem vários tipos de glicosaminoglicanos com diferentes propriedades biológicas mas que, devido a sua baixa biodisponibilidade, difícil extração e produção, não são muito utilizados em dispositivos para libertação controlada. Contudo, devido às suas propriedades biológicas, estes glicosaminoglicanos, incluindo o sulfato de dermatano, o sulfato de heparano e o sulfato de queratano, são muitas vezes utilizados como princípios ativos em suplementos. O sulfato de dermatano é um glicosaminoglicano cuja estrutura possui resíduos alternados de N-acetilglucosamina ou ácido glucurónico ligados nas conformações β -1,4 ou β -1,3. Pode apresentar também resíduos de ácido idurónico, sendo essa a principal diferença entre o sulfato de dermatano e o sulfato de condroitina. O sulfato de dermatano é extraído principalmente da pele de raia e apresenta diferentes propriedades biológicas, como estabilizador de cofatores e co-recetores de fatores de crescimento e citocinas, o que lhe confere atividade anticoagulante, à semelhança do sulfato de condroitina (Trowbridge e Gallo, 2002).

Devido à sua atividade anticoagulante, o sulfato de dermatano é visto como sério substituto da heparina (Teien e col., 1976). Outra abordagem sugere a construção de fármacos contendo este tipo de glicosaminoglicano para ser administrado como anticoagulantes e antitrombóticos. A heparina é o fármaco normalmente administrado como agente anticoagulante, mas ultimamente tem sido alvo de estudo devido à possibilidade de indução de trombocitopenia, dislipidemia, osteoporose e reações alérgicas (Nelson-Piercy, 1997). O sulfato de dermatano tem propriedades anticoagulantes pela inibição da trombina, mas não tem efeito no fator X da cascata de coagulação, nem interfere na função das plaquetas, o que justifica o sulfato de dermatano como um bom candidato para substituto da heparina. Estudos recentes revelaram a atividade anticoagulante do sulfato de dermatano sem causar as complicações possíveis presentes nos tratamentos feitos com heparina (Vitale e col., 2013).

O sulfato de heparano é também um glicosaminoglicano cuja estrutura é muito similar à da heparina. É composto por uma cadeia alternada de D-ácido glucurônico ou ácido idurônico e resíduos de D-glucosamina, podendo este último estar na forma sulfatada ou acetilada. A distribuição dos grupos pode definir algumas das propriedades biológicas do sulfato de heparano. Devido à presença de grupos sulfatados, pode ligar-se a uma série de proteínas e regular diferentes processos biológicos como a coagulação, regulação e sinalização de fatores de crescimento e de outras citocinas. O número de grupos sulfatados pode influenciar a afinidade com outras proteínas, podendo alterar as suas propriedades biológicas (Kreuger e col., 2006). Além da sua atividade anticoagulante, o sulfato de heparano tem a capacidade de ligar-se a diferentes polipéptidos, como, por exemplo, ao complexo formado pelo recetor celular e um fator de crescimento. Estes complexos estão associados ao aumento da proliferação celular que pode dar origem a processos de oncogénese. O sulfato de heparano tem um papel muito importante no cancro, estando associado ao aumento na proliferação de células cancerígenas, à angiogénese em tumores, à formação de metástases e à diferenciação de células cancerígenas (Sasisekharan e col., 2002). A modificação química do sulfato de heparano pode interferir na sua atividade anticoagulante e pode ter efeitos terapêuticos em tumores. O grande envolvimento do sulfato de heparano em diferentes estádios na formação de tumores sugere que este polímero pode ajudar no desenvolvimento de novos

métodos de diagnóstico, na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, e também na possibilidade de desenvolver novas abordagens na criação de dispositivos para a libertação controlada de agentes bioativos em tratamentos contra o cancro (Knelson e col., 2014).

O sulfato de queratano é outro glicosaminoglicano composto por uma unidade básica de um dissacarídeo que se repete. Essa unidade é normalmente composta por resíduos de galactose e N-acetil-glucosamina ligados na conformação β -1,4. O sulfato de queratano também possui nas extremidades uma região de ligação a proteínas. Existem três classes diferentes de sulfato de queratano, cuja diferença se encontra na natureza da região de ligação a proteínas. A classe I é conhecida pela sua presença na córnea e em pequenas cartilagens. A ligação à proteína é dada pelo N- da N-acetil glucosamina a uma asparagina. Na classe II a ligação à proteína é feita pelo O- da N-acetil glucosamina a uma serina ou treonina. Por último, na classe III (que foi isolada pela primeira vez do tecido nervoso), a ligação à proteína é pelo O- da manose a uma serina ou treonina (Uchimura, 2015). A presença de sulfato de queratano nos tecidos está relacionada com a manutenção dos níveis de hidratação do tecido corneal, que pode influenciar os seus níveis de transparência. Estudos a nível celular revelaram que o sulfato de queratano apresenta propriedades antiadesivas. Em tecidos nervosos, o sulfato de queratano pode impedir o crescimento de axónios, e nos tecidos cartilaginosos pode diminuir a capacidade de resposta imunitária em doenças como a osteoartrite (Funderburgh, 2002).

3. Considerações finais

Os polissacarídeos de origem marinha têm revelado uma grande aplicabilidade em sistemas de libertação controlada. O facto de serem biocompatíveis, não-tóxicos e muitas vezes biodegradáveis fazem destes polímeros materiais ideais para a construção de novos dispositivos de carga para sistemas de libertação controlada de agentes bioativos. Estes dispositivos podem ser construídos utilizando diferentes metodologias e são capazes de incorporar diferentes tipos de biomoléculas. A libertação destas biomoléculas pode ocorrer através de diferentes mecanismos, cujo controlo poderá promover uma libertação sustentada. Devido ao facto destes materiais serem biocompatíveis e muitas vezes biodegradáveis,

a sua utilização na construção de dispositivos de libertação controlada conseguiu em alguns casos aumentar a eficácia de libertação. O aspeto económico também é muito importante, tendo em conta que estes materiais são abundantes e são de fácil extração, purificação e modificação química, existindo também a possibilidade de uma produção em grande escala. Todas estas características fazem destes biomateriais e dos seus derivados excelentes materiais para a construção não só de dispositivos de carga mas também de outras formulações farmacêuticas como excipientes ou como princípios ativos em alguns suplementos. Em sistemas de libertação controlada, os biomateriais de origem natural permitem a possibilidade de incorporar uma enorme variedade de proteínas, fármacos e ácidos nucleicos, que não seria possível pela utilização de materiais de origem sintético, que em alguns casos podem ser tóxicos para o organismo.

O mar pode funcionar como uma grande fonte de extração destes biomateriais. Entre os diferentes organismos marinhos, as algas, peixes e crustáceos são a principal fonte de polissacarídeos. Este tipo de extração pode ajudar a que haja uma diminuição na extração de biomateriais a partir de animais mamíferos, muitas vezes associados a riscos de contaminação e contágio de doenças. Um maior investimento na área de investigação dos recursos marinhos pode ajudar a entender melhor os mecanismos de funcionamento destes materiais e também pode promover a descoberta de novos materiais e novas funcionalidades para aplicações biomédicas. Esse investimento seria justificado pelo desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento de doenças degenerativas ou o cancro e também em medicina regenerativa. Existe ainda a possibilidade de desenvolver dispositivos de carga para a libertação controlada de biomoléculas no sistema nervoso central e para o tratamento de doenças genéticas.

Um maior conhecimento destes materiais e dos seus derivados poderá ajudar a desenvolver sistemas com vista a diferentes vias de administração de forma a aumentar a eficácia do agente terapêutico. Para isso é preciso promover e continuar com os apoios à investigação nesta área, de modo a otimizar os processos de libertação e administração, e minimizar os custos de produção. Para isso será necessário haver mais investigação do ponto de vista do isolamento e purificação de biopolímeros de origem marinha, e também na sua modificação química, de forma a controlar a interação

com os fármacos e os tecidos, e a resposta inteligente e direcionada dos agentes. Estratégias futuras deverão também combinar a possibilidade de libertação controlada a partir deste tipo de dispositivos com a capacidade de diagnóstico (abordagens terapêuticas), onde plataformas envolvendo nanotecnologias e imagem deverão ser tidas em consideração.

Agradecimentos

Rui R. Costa agradece o apoio financeiro da Fundação para a Ciência e Tecnologia (bolsa com a referência SFRH/BPD/95446/2013), do Fundo Social Europeu (FSE) e do Programa Operacional de Potencial Humano (POPH).

Referências bibliográficas

- Agnihotri S. A., Mallikarjuna N. N., Aminabhavi T. M. (2004) Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 100: 5-28.
- Allen T. M., Cullis P. R. (2004) Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303: 1818-1822.
- Alves A., Duarte A. R. C., Mano J. F., Sousa R. A., Reis R. L. (2012a) PDLLA enriched with ulvan particles as a novel 3D porous scaffold targeted for bone engineering. *Journal of Supercritical Fluids*, 65: 32-38.
- Alves A., Pinho E. D., Neves N. M., Sousa R. A., Reis R. L. (2012b) Processing ulvan into 2D structures: cross-linked ulvan membranes as new biomaterials for drug delivery applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 426: 76-81.
- Alves A., Sousa R. A., Reis R. L. (2013a) In vitro cytotoxicity assessment of ulvan, a polysaccharide extracted from green algae. *Phytotherapy Research*, 27: 1143-1148.
- Alves A., Sousa R. A., Reis R. L. (2013b) A practical perspective on ulvan extracted from green algae. *Journal of Applied Phycology*, 25: 407-424.
- Alves N. M., Mano J. F. (2008) Chitosan derivatives obtained by chemical modifications for biomedical and environmental applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 43: 401-414.
- Anastyuk S. D., Shevchenko N. M., Ermakova S. P., Vishchuk O. S., Nazarenko E. L., e col. (2012) Anticancer activity in vitro of a fucoidan from the brown alga *Fucus evanescens* and its low-molecular fragments, structurally characterized by tandem mass-spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, 87: 186-194.
- Andrade F., Goycoolea F., Chiappetta D. A., das Neves J., Sosnik A. e col. (2011) Chitosan-grafted copolymers and chitosan-ligand conjugates as matrices for

- pulmonary drug delivery. *International Journal of Carbohydrate Chemistry*, 2011: 14 p.
- Aktar B., Erdal M. S., Sagirli O., Güngör S., Özsoy Y. (2014) Optimization of biopolymer based transdermal films of metoclopramide as an alternative delivery approach. *Polymers*, 6: 1350-1365.
- Augst A. D., Kong H. J., Mooney D. J. (2006) Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, 6: 623-633.
- Azevedo H. S., Reis R. L. (2005) Understanding the enzymatic degradation of biodegradable polymers and strategies to control their degradation rate. *Biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine*. Boca Raton, FL: CRC Press: 177-201.
- Bansal V., Sharma P. K., Sharma N., Pal O. P., Malviya R. (2011) Applications of chitosan and chitosan derivatives in drug delivery. *Advances in Biological Research*, 5: 28-37.
- Barahona T., Chandia N. P., Encinas M. V., Matsuhira B., Zuniga E. A. (2011) Antioxidant capacity of sulfated polysaccharides from seaweeds. A kinetic approach. *Food Hydrocolloids*, 25: 529-535.
- Becker A. L., Johnston A. P., Caruso F. (2010) Layer-by-layer-assembled capsules and films for therapeutic delivery. *Small*, 6: 1836-1852.
- Beneke C. E., Viljoen A. M., Hamman J. H. (2009) Polymeric plant-derived excipients in drug delivery. *Molecules*, 14: 2602-2620.
- Bhattarai N., Gunn J., Zhang M. (2010) Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62: 83-99.
- Bhise K. S., Dhupal R. S., Paradkar A. R., Kadam S. S. (2008) Effect of drying methods on swelling, erosion and drug release from chitosan-naproxen sodium complexes. *AAPS PharmSciTech*, 9: 1-12.
- Bonferoni M. C., Rossi S., Ferrari F., Bertoni M., Bolhuis G. K. e col. (1998) On the employment of lambda carrageenan in a matrix system. III. Optimization of a lambda carrageenan-HPMC hydrophilic matrix. *Journal of Controlled Release*, 51: 231-239.
- Borchard G. (2001) Chitosans for gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 52: 145-150.
- Bornhöft M., Thommes M., Kleinebudde P. (2005) Preliminary assessment of carrageenan as excipient for extrusion/spheronisation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 59: 127-131.
- Bouhlar R., Haslin C., Chermann J. C., Collic-Jouault S., Sinquin C. e col. (2011) Antiviral activities of sulfated polysaccharides isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales). *Marine Drugs*, 9: 1187-1209.
- Brannon-Peppas L., Blanchette J. O. (2012) Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64: 206-212.

- Burdick J. A., Prestwich G. D. (2011) Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials*, 23: H41-H56.
- Campo V. L., Kawano D. F., da Silva D. B., Carvalho I. (2009) Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis - A review. *Carbohydrate Polymers*, 77: 167-180.
- Carlucci M., Ciancia M., Matulewicz M., Cerezo A., Damonte E. (1999) Antiherpetic activity and mode of action of natural carrageenans of diverse structural types. *Antiviral research*, 43: 93-102.
- Chandy T., Mooradian D. L., Rao G. H. (1998) Chitosan/polyethylene glycol-alginate microcapsules for oral delivery of hirudin. *Journal of Applied Polymer Science*, 70: 2143-2153.
- Chen S. C., Wu Y. C., Mi F. L., Lin Y. H., Yu L. C., Sung H. W. (2004) A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 96: 285-300.
- Chen M. C., Hsu W. L., Hwang P. A., Chou T. C. (2015) Low molecular weight fucoidan inhibits tumor angiogenesis through downregulation of HIF-1/VEGF signaling under hypoxia. *Marine Drugs*, 13: 4436-4451.
- Chen W. Y., Abatangelo G. (1999) Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen*, 7: 79-89.
- Cho Y. W., Kim J. D., Park K. (2003) Polycation gene delivery systems: escape from endosomes to cytosol. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 55: 721-734.
- Ciancia M., Quintana I., Cerezo A. S. (2010) Overview of anticoagulant activity of sulfated polysaccharides from seaweeds in relation to their structures, focusing on those of green seaweeds. *Current Medicinal Chemistry*, 17: 2503-2529.
- Clegg D. O., Reda D. J., Harris C. L., Klein M. A., O'Dell J. R. e col. (2006) Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *The New England Journal of Medicine*, 354: 795-808.
- Contreras-Ruiz L., de la Fuente M., Parraga J. E., López-García A., Fernández I. e col. (2011) Intracellular trafficking of hyaluronic acid-chitosan oligomer-based nanoparticles in cultured human ocular surface cells. *Molecular Vision*, 17: 279-290.
- Correia C. R., Reis R. L., Mano J. F. (2013a) Multilayered hierarchical capsules providing cell adhesion sites. *Biomacromolecules*, 14: 743-751.
- Correia C. R., Sher P., Reis R. L., Mano J. F. (2013b) Liquified chitosan-alginate multilayer capsules incorporating poly(l-lactic acid) microparticles as cell carriers. *Soft Matter*, 9: 2125-2130.
- Costa A. M., Alatorre-Meda M., Oliveira N. M., Mano J. F. (2014) Biocompatible polymeric microparticles produced by a simple biomimetic approach. *Langmuir*, 30: 4535-4539.

- Costa C., Alves A., Pinto P. R., Sousa R. A., da Silva E. A. B. e col. (2012) Characterization of ulvan extracts to assess the effect of different steps in the extraction procedure. *Carbohydrate Polymers*, 88: 537-546.
- Costa N. L., Sher P., Mano J. F. (2011) Liquefied capsules coated with multilayered polyelectrolyte films for cell immobilization. *Advanced Engineering Materials*, 13: B218-B224.
- Costa R. R., Custodio C. A., Arias F. J., Rodríguez-Cabello J. C., Mano J. F. (2013) Nanostructured and thermoresponsive recombinant biopolymer-based microcapsules for the delivery of active molecules. *Nanomedicine*, 9: 895-902.
- Costa R. R., Mano J. F. (2014) Polyelectrolyte multilayered assemblies in biomedical technologies. *Chemical Society Reviews*, 43: 3453-3479.
- Couto D. S., Hong Z., Mano J. F. (2009) Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, 5: 115-123.
- Cumashi A., Ushakova N. A., Preobrazhenskaya M. E., D'Incecco A., Piccoli A. e col. (2007) A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. *Glycobiology*, 17: 541-552.
- d'Ayala G. G., Malinconico M., Laurienzo P. (2008) Marine derived polysaccharides for biomedical applications: chemical modification approaches. *Molecules*, 13: 2069-2106.
- Dash M., Samal S. K., Bartoli C., Morelli A., Smet P. F. e col. (2014) Biofunctionalization of ulvan scaffolds for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 6: 3211-3218.
- de la Fuente M., Seijo B., Alonso M. J. (2008) Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49: 2016-2024.
- De Smedt S. C., Demeester J., Hennink W. E. (2000) Cationic polymer based gene delivery systems. *Pharmaceutical Research*, 17: 113-126.
- Duarte A. R., Unal B., Mano J. F., Reis R. L., Jensen K. F. (2014) Microfluidic production of perfluorocarbon-alginate core-shell microparticles for ultrasound therapeutic applications. *Langmuir*, 30: 12391-12399.
- Ermakova S., Sokolova R., Kim S. M., Um B. H., Isakov V. e col. (2011) Fucoidans from brown seaweeds *Sargassum hornery*, *Eclonia cava*, *Costaria costata*: structural characteristics and anticancer activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164: 841-850.
- Funderburgh J. L. (2002) Keratan sulfate biosynthesis. *IUBMB Life*, 54: 187-194.
- Gasperini L., Mano J. F., Reis R. L. (2014) Natural polymers for the microencapsulation of cells. *Journal of The Royal Society Interface*, 11: 20140817.
- George M., Abraham T. E. (2006) Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *Journal of Controlled Release*, 114: 1-14.

- Giunchedi P., Gavini E., Moretti M. D., Pirisino G. (2000) Evaluation of alginate compressed matrices as prolonged drug delivery systems. *AAPS PharmSciTech*, 1: 31-36.
- Grech J. M. R., Mano J. F., Reis R. L. (2008) Chitosan beads as templates for layer-by-layer assembly and their application in the sustained release of bioactive agents. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 23: 367-380.
- Grenha A., Gomes M. E., Rodrigues M., Santo V. E., Mano J. F. e col. (2010) Development of new chitosan/carrageenan nanoparticles for drug delivery applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 92: 1265-1272.
- Guo Y., Shi X., Fang Q., Zhang J., Fang H. e col. (2014) Facile preparation of hydroxyapatite-chondroitin sulfate hybrid mesoporous microrods for controlled and sustained release of antitumor drugs. *Materials Letters*, 125: 111-115.
- Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. (2008) Hydrogel nanoparticles in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 1638-1649.
- Hoare T. R., Kohane D. S. (2008) Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 49: 1993-2007.
- Huang Y. C., Lam U. I. (2011) Chitosan/fucoidan pH sensitive nanoparticles for oral delivery system. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58: 779-785.
- Ilium L. (1998) Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, 15: 1326-1331.
- Iskandar F., Nandiyanto A. B., Widiyastuti W., Young L. S., Okuyama K. e col. (2009) Production of morphology-controllable porous hyaluronic acid particles using a spray-drying method. *Acta Biomaterialia*, 5: 1027-1034.
- Jayakumar R., Prabakaran M., Reis R. L., Mano J. F. (2005) Graft copolymerized chitosan - present status and applications. *Carbohydrate Polymers*, 62: 142-158.
- Jayakumar R., Reis R. L., Mano J. F. (2007) Synthesis and characterization of pH-sensitive thiol-containing chitosan beads for controlled drug delivery applications. *Drug Delivery*, 14: 9-17.
- Jiang T., Zhang Z., Zhang Y., Lv H., Zhou J. e col. (2012) Dual-functional liposomes based on pH-responsive cell-penetrating peptide and hyaluronic acid for tumor-targeted anticancer drug delivery. *Biomaterials*, 33: 9246-9258.
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart H. S. (2011) Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. *Marine Drugs*, 9: 196-223.
- Jimeno J., López-Martín J. A., Ruiz-Casado A., Izquierdo M. A., Scheuer P. J. e col. (2004) Progress in the clinical development of new marine-derived anticancer compounds. *Anticancer Drugs*, 15: 321-329.
- Jimeno J. M. (2002) A clinical armamentarium of marine-derived anti-cancer compounds. *Anticancer Drugs*, 13 Suppl 1: S15-9.
- Kean T., Roth S., Thanou M. (2005) Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 103: 643-653.

- Kim I. Y., Seo S. J., Moon H. S., Yoo M. K., Park I. Y. e col. (2008a) Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, 26: 1-21.
- Kim S. K. 2013. *Marine Biomaterials: characterization, isolation and applications*, CRC Press. 840 p.
- Kim S. J., Park S. Y., Kim C. W. (2006) A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 1849-1855.
- Kim S. K., Ravichandran Y. D., Khan S. B., Kim Y. T. (2008b) Prospective of the cosmeceuticals derived from marine organisms. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 13: 511-523.
- Knelson E. H., Nee J. C., Blobe G. C. (2014) Heparan sulfate signaling in cancer. *Trends in Biochemical Sciences*, 39: 277-288.
- Kogan G., Soltés L., Stern R., Gemeiner P. (2007) Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 29: 17-25.
- Kramer M. W., Escudero D. O., Lokeshwar S. D., Golshani R., Ekwenna O. O. e col. (2011) Association of hyaluronic acid family members (HAS1, HAS2, and HYAL-1) with bladder cancer diagnosis and prognosis. *Cancer*, 117: 1197-1209.
- Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2003) Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13: 3-13.
- Kreuger J., Spillmann D., Li J. P., Lindahl U. (2006) Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *The Journal of Cell Biology*, 174: 323-327.
- Kurita K. (2006) Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8: 203-226.
- Lahaye M., Robic A. (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules*, 8: 1765-1774.
- Laurienzo P. (2010) Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Marine Drugs*, 8: 2435-2465.
- Lee H., Lee K., Kim I. K., Park T. G. (2008) Synthesis, characterization, and in vivo diagnostic applications of hyaluronic acid immobilized gold nanoprobe. *Biomaterials*, 29: 4709-4718.
- Lee K. Y., Mooney D. J. (2001) Hydrogels for tissue engineering. *Chemical Reviews*, 101: 1869-1880.
- Li B., Lu F., Wei X., Zhao R. (2008) Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13: 1671-1695.
- Li L., Ni R., Shao Y., Mao S. (2014) Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 103: 1-11.
- Lima A. C., Sher P., Mano J. F. (2012) Production methodologies of polymeric and hydrogel particles for drug delivery applications. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 9: 231-248.

- Lindahl U., Lidholt K., Spillmann D., Kjellén L. (1994) More to "heparin" than anticoagulation. *Thrombosis Research*, 75: 1-32.
- Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z. (2008) Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60: 1650-1662.
- Luna S. M., Gomes M. E., Mano J. F., Reis R. L. (2010) Development of a novel cell encapsulation system based on natural origin polymers for tissue engineering applications. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25: 341-359.
- Luo Y., Kirker K. R., Prestwich G. D. (2000) Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 69: 169-184.
- Mandal S., Basu S. K., Sa B. (2010) Ca²⁺ ion cross-linked interpenetrating network matrix tablets of polyacrylamide-grafted-sodium alginate and sodium alginate for sustained release of diltiazem hydrochloride. *Carbohydrate Polymers*, 82: 867-873.
- Mano J. F. (2008) Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications. *Advanced Engineering Materials*, 10: 515-527.
- Mano J. F. (2015) Designing biomaterials for tissue engineering based on the deconstruction of the native cellular environment. *Materials Letters*, 141: 198-202.
- Mero A., Campisi M. (2014) Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers*, 6: 346-369.
- Mohamadnia Z., Zohuriaan-Mehr A. J., Kabiri K., Jamshidi A., Mobedi H. (2007) pH-Sensitive IPN hydrogel beads of carrageenan-alginate for controlled drug delivery. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 22: 342-356.
- Mohammad E.-D., Xuefei H. 2011. Biological applications of hyaluronic acid functionalized nanomaterials. *Petite and Sweet: Glyco-Nanotechnology as a Bridge to New Medicines*. ACS Symposium Series, 1091: 181-213.
- Molinski T. F., Dalisay D. S., Lievens S. L., Saludes J. P. (2009) Drug development from marine natural products. *Nature Reviews Drug Discovery*, 8: 69-85.
- Morelli A., Chiellini F. (2010) Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: functionalization and hydrogel preparation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 211: 821-832.
- Munro M. H., Blunt J. W., Dumdei E. J., Hickford S. J., Lill R. E. e col. (1999) The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 70: 15-25.
- Murado M. A., Montemayor M. I., Cabo M. L., Vázquez J. A., González M. P. (2012) Optimization of extraction and purification process of hyaluronic acid from fish eyeball. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 491-498.
- Murakami K., Aoki H., Nakamura S., Nakamura S., Takikawa M. e col. (2010) Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoïdan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 31: 83-90.
- Nakamura S., Nambu M., Ishizuka T., Hattori H., Kanatani Y. e col. (2008) Effect of controlled release of fibroblast growth factor-2 from chitosan/fucoïdan

- micro complex-hydrogel on in vitro and in vivo vascularization. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 85: 619-27.
- Nazar H., Fatouros D. G., van der Merwe S. M., Bouropoulos N., Avgouropoulos G. e col. (2011) Thermosensitive hydrogels for nasal drug delivery: the formulation and characterisation of systems based on N-trimethyl chitosan chloride. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 77: 225-232.
- Nelson-Piercy C. (1997) Hazards of heparin: allergy, heparin-induced thrombocytopenia and osteoporosis. *Baillière's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 11: 489-509.
- Neto A. I., Cibrao A. C., Correia C. R., Carvalho R. R., Luz G. M. e col. (2014) Nanostructured polymeric coatings based on chitosan and dopamine-modified hyaluronic acid for biomedical applications. *Small*, 10: 2459-2469.
- Newman D. J., Cragg G. M. (2014) Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Marine Drugs*, 12: 255-278.
- Ngo D. H., Kim S. K. (2013) Sulfated polysaccharides as bioactive agents from marine algae. *International Journal of Biological Macromolecules*, 62: 70-75.
- Novoa-Carballeda R., Silva C., Moller S., Schnabelrauch M., Reis R. L. e col. (2014) Tunable nano-carriers from clicked glycosaminoglycan block copolymers. *Journal of Materials Chemistry B*, 2: 4177-4184.
- Oliveira S. M., Santo V. E., Gomes M. E., Reis R. L., Mano J. F. (2015) Layer-by-layer assembled cell instructive nanocoatings containing platelet lysate. *Biomaterials*, 48: 56-65.
- Oliveira S. M., Silva T. H., Reis R. L., Mano J. F. (2013) Nanocoatings containing sulfated polysaccharides prepared by layer-by-layer assembly as models to study cell-material interactions. *Journal of Materials Chemistry B*, 1: 4406-4418.
- Pack D. W., Hoffman A. S., Pun S., Stayton P. S. (2005) Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4: 581-593.
- Pinheiro A. C., Bourbon A. I., Cerqueira M. A., Maricato E., Nunes C., e col. (2015) Chitosan/fucoidan multilayer nanocapsules as a vehicle for controlled release of bioactive compounds. *Carbohydrate Polymers*, 115: 1-9.
- Pomponi S. A. (1999) The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, 70: 5-13.
- Pomponi S. A. (2001) The oceans and human health: the discovery and development of marine-derived drugs. *Oceanography*, 14: 78-87.
- Popa E. G., Carvalho P. P., Dias A. F., Santos T. C., Santo V. E. e col. (2014) Evaluation of the in vitro and in vivo biocompatibility of carrageenan-based hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102: 4087-4097.
- Popa E. G., Gomes M. E., Reis R. L. (2011) Cell delivery systems using alginate-carrageenan hydrogel beads and fibers for regenerative medicine applications. *Biomacromolecules*, 12: 3952-3961.

- Popa E. G., Rodrigues M. T., Coutinho D. F., Oliveira M. B., Mano J. F. e col. (2013) Cryopreservation of cell laden natural origin hydrogels for cartilage regeneration strategies. *Soft Matter*, 9: 875-885.
- Prabaharan M., Mano J. F. (2005a) Chitosan-based particles as controlled drug delivery systems. *Drug Delivery*, 12: 41-57.
- Prabaharan M., Mano J. F. (2005b) Hydroxypropyl chitosan bearing beta-cyclodextrin cavities: synthesis and slow release of its inclusion complex with a model hydrophobic drug. *Macromolecular Bioscience*, 5: 965-973.
- Prabaharan M., Mano J. F. (2006) Chitosan derivatives bearing cyclodextrin cavities as novel adsorbent matrices. *Carbohydrate Polymers*, 63: 153-166.
- Prabaharan M., Mano J. F. (2007) A novel pH and thermo-sensitive N,O-carboxymethyl chitosan-graft-poly(N-isopropylacrylamide) hydrogel for controlled drug delivery. *E-Polymers*, 7: 503-516.
- Prabaharan M., Reis R. L., Mano J. F. (2007) Carboxymethyl chitosan-graft-phosphatidylethanolamine: Amphiphilic matrices for controlled drug delivery. *Reactive & Functional Polymers*, 67: 43-52.
- Prajapati V. D., Maheriya P. M., Jani G. K., Solanki H. K. (2014) Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. *Carbohydrate Polymers*, 105: 97-112.
- Ramadas M., Paul W., Dileep K. J., Anitha Y., Sharma C. P. (2000) Lipoinulin encapsulated alginate-chitosan capsules: intestinal delivery in diabetic rats. *Journal of Microencapsulation*, 17: 405-411.
- Ren D., Yi H., Wang W., Ma X. (2005) The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydrate Research*, 340: 2403-2410.
- Rezanejade-Bardajee G., Hooshyar Z., Pourhasan Y. (2011) The effect of multidentate biopolymer based on polyacrylamide grafted onto kappa-carrageenan on the spectrofluorometric properties of water-soluble CdS quantum dots. *International Journal of Spectroscopy*, 2011: 6p.
- Rinaudo M. (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31: 603-632.
- Rinaudo M. (2008) Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57: 397-430.
- Rinehart K. L. (2000) Antitumor compounds from tunicates. *Medicinal Research Reviews*, 20: 1-27.
- Rocha P. M., Santo V. E., Gomes M. E., Reis R. L., Mano J. F. (2011) Encapsulation of adipose-derived stem cells and transforming growth factor- 1 in carrageenan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 26: 493-507.
- Rossi F., Santoro M., Casalini T., Veglianesi P., Masi M. e col. (2011) Characterization and degradation behavior of agar-carbomer based hydrogels for drug delivery

- applications: solute effect. *International Journal of Molecular Sciences*, 12: 3394-3408.
- Roy K., Mao H. Q., Huang S. K., Leong K. W. (1999) Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nature Medicine*, 5: 387-391.
- Russo R., Malinconico M., Santagata G. (2007) Effect of cross-linking with calcium ions on the physical properties of alginate films. *Biomacromolecules*, 8: 3193-3197.
- Santo V. E., Gomes M. E., Mano J. F., Reis R. L. (2012) Chitosan-chondroitin sulphate nanoparticles for controlled delivery of platelet lysates in bone regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6 Suppl 3: s47-59.
- Santos J. R., Alves N. M., Mano J. F. (2010) New thermo-responsive hydrogels based on poly (N-isopropylacrylamide)/hyaluronic acid semi-interpenetrated polymer networks: Swelling properties and drug release studies. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, 25: 169-184.
- Saranya N., Moorthi A., Saravanan S., Devi M. P., Selvamurugan N. (2011) Chitosan and its derivatives for gene delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48: 234-8.
- Sasisekharan R., Shriver Z., Venkataraman G., Narayanasami U. (2002) Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2: 521-528.
- Sato K., Takahashi S., Anzai J. (2012) Layer-by-layer thin films and microcapsules for biosensors and controlled release. *Analytical sciences*, 28: 929-938.
- Sato T., Ishii T., Okahata Y. (2001) In vitro gene delivery mediated by chitosan. effect of pH, serum, and molecular mass of chitosan on the transfection efficiency. *Biomaterials*, 22: 2075-2080.
- Schaeffer D. J., Krylov V. S. (2000) Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45: 208-227.
- Schmaljohann D. (2006) Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58: 1655-1670.
- Schwartzmann G., da Rocha A. B., Berlinck R. G. S., Jimeno J. (2001) Marine organisms as a source of new anticancer agents. *The Lancet Oncology*, 2: 221-225.
- Sezer A., Cevher E. 2011. Fucoïdan: A versatile biopolymer for biomedical applications. In: Zilberman, M. (ed.) *Active Implants and Scaffolds for Tissue Regeneration. Studies in Mechanobiology, Tissue Engineering and Biomaterials*, 8: 377-406.
- Sezer A. D., Akbuga J. (2006) Fucosphere-new microsphere carriers for peptide and protein delivery: preparation and in vitro characterization. *Journal of Microencapsulation*, 23: 513-522.
- Sezer A. D., Cevher E., Hatipoglu F., Ogurtan Z., Bas A. L. e col. (2008) The use of fucosphere in the treatment of dermal burns in rabbits. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69: 189-198.

- Shi J., Alves N. M., Mano J. F. (2006) Drug release of pH/temperature-responsive calcium alginate/poly(N-isopropylacrylamide) semi-IPN beads. *Macromolecular Bioscience*, 6: 358-363.
- Shi J., Alves N. M., Mano J. F. (2008a) Chitosan coated alginate beads containing poly(N-isopropylacrylamide) for dual-stimuli-responsive drug release. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84: 595-603.
- Shi J., Liu L., Sun X., Cao S., Mano J. F. (2008b) Biomaterialized polysaccharide beads for dual-stimuli-responsive drug delivery. *Macromolecular Bioscience*, 8: 260-267.
- Silva F. R. F., Dore C. M. P. G., Marques C. T., Nascimento M. S., Benevides N. M. B. e col. (2010) Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: Action of major types of commercial carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 79: 26-33.
- Silva T. H., Alves A., Ferreira B. M., Oliveira J. M., Reys L. L. e col. (2012a) Materials of marine origin: a review on polymers and ceramics of biomedical interest. *International Materials Reviews*, 57: 276-307.
- Silva T. H., Alves A., Popa E. G., Reys L. L., Gomes M. E. e col. (2012b) Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatters*, 2: 278-289.
- Silva T. H., Duarte A. R., Moreira-Silva J., Mano J. F., Reis R. L. (2012c). Biomaterials from Marine-Origin Biopolymers. In: Mano, J. F. (ed.) *Biomimetic Approaches for Biomaterials Development*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.
- Simões S., Moreira J. N., Fonseca C., Düzgüneş N., Pedroso de Lima M. C. (2004) On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 947-965.
- Sinha V. R., Singla A. K., Wadhawan S., Kaushik R., Kumria R. e col. (2004) Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 274: 1-33.
- Sirkiä T., Salonen H., Veski P., Jürjenson H., Marvola M. (1994) Biopharmaceutical evaluation of new prolonged-release press-coated ibuprofen tablets containing sodium alginate to adjust drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 107: 179-187.
- Sithranga-Boopathy N., Kathiresan K. (2010) Anticancer drugs from marine flora: an overview. *Journal of Oncology*, 2010: 18 p.
- Song W. L., Lima A. C., Mano J. F. (2010) Bioinspired methodology to fabricate hydrogel spheres for multi-applications using superhydrophobic substrates. *Soft Matter*, 6: 5868-5871.
- Suárez-Jiménez G. M., Burgos-Hernández A., Ezquerro-Brauer J. M. (2012) Bioactive peptides and depsipeptides with anticancer potential: sources from marine animals. *Marine Drugs*, 10: 963-986.
- Szarpak A., Cui D., Dubreuil F., De Geest B. G., De Cock L. e col. (2010) Designing hyaluronic acid-based layer-by-layer capsules as a carrier for intracellular drug delivery. *Biomacromolecules*, 11: 713-720.

- Tahrir F. G., Ganji F., Ahooyi T. M. (2014) Injectable thermosensitive chitosan/glycerophosphate-based hydrogel for tissue engineering and drug delivery applications: A review. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation Journal*, .
- Tapia C., Corbalan V., Costa E., Gai M. N., Yazdani-Pedram M. (2005) Study of the release mechanism of diltiazem hydrochloride from matrices based on chitosan-alginate and chitosan-carrageenan mixtures. *Biomacromolecules*, 6: 2389-2395.
- Teien A. N., Abildgaard U., Hook M. (1976) The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate. *Thrombosis Research*, 8: 859-867.
- Thomas C. E., Ehrhardt A., Kay M. A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, 4: 346-358.
- Thomas M., Klibanov A. M. (2003) Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 27-34.
- Tonnesen H. H., Karlsen J. (2002) Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28: 621-630.
- Trowbridge J. M., Gallo R. L. (2002) Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 12: 117R-125R.
- Uchimura K. 2015. Keratan sulfate: Biosynthesis, structures, and biological functions. In: Kuberan Balagurunathan, Hiroshi Nakato e Desai, U. R. (eds.) *Glycosaminoglycans. Methods in Molecular Biology*, 1229: 389-400.
- Valoti G., Nicoletti M. I., Pellegrino A., Jimeno J., Hendriks H. e col. (1998) Ecteinascidin-743, a new marine natural product with potent antitumor activity on human ovarian carcinoma xenografts. *Clinical Cancer Research*, 4: 1977-1983.
- Varum K. M., Myhr M. M., Hjerde R. J., Smidsrod O. (1997) In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum. *Carbohydrate Research*, 299: 99-101.
- Vázquez J. A., Rodríguez-Amado I., Montemayor M. I., Fraguas J., González M. d. P. e col. (2013) Chondroitin sulfate, hyaluronic acid and chitin/chitosan production using marine waste sources: Characteristics, applications and eco-friendly processes: A review. *Marine drugs*, 11: 747-774.
- Venkatesan J., Kim S. K. (2010) Chitosan composites for bone tissue engineering-an overview. *Marine Drugs*, 8: 2252-2266.
- Vitale C., Berutti S., Bagnis C., Soragna G., Gabella P., Fruttero C. e Marangella M. (2013) Dermatan sulfate: an alternative to unfractionated heparin for anticoagulation in hemodialysis patients. *Journal of Nephrology*, 26: 158-163.
- Vo T. S., Ngo D. H. e Kim S. K. (2012) Potential targets for anti-inflammatory and anti-allergic activities of marine algae: an overview. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 11: 90-101.
- Wang D. A., Varghese S., Sharma B., Strehin I., Fermanian S. y col. (2007) Multifunctional chondroitin sulphate for cartilage tissue-biomaterial integration. *Nature Materials*, 6: 385-392.

- Wijesekara I., Pangestuti R., Kim S. K. (2011) Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydrate Polymers*, 84: 14-21.
- Wu J., Su Z. G., Ma G. H. (2006) A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. *Internacional Journal of Pharmaceutics*, 315: 1-11.
- Wu J., Wei W., Wang L. Y., Su Z. G., Ma G. H. (2007) A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. *Biomaterials*, 28: 2220-2232.
- Yan L., Oliveira J. M., Oliveira A. L., Reis R. L. (2015) Current concepts and challenges in osteochondral tissue engineering and regenerative medicine. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 1 (4): 183-200.
- Zhang F., Lee K., Linhardt R. (2015) SPR biosensor probing the interactions between TIMP-3 and Heparin/GAGs. *Biosensors*, 5: 500-512.
- Zhao Q., Han B., Wang Z., Gao C., Peng C., Shen J. (2007) Hollow chitosan-alginate multilayer microcapsules as drug delivery vehicle: doxorubicin loading and in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine*, 3: 63-74.
- Zhong S. P., Campoccia D., Doherty P. J., Williams R. L., Benedetti L. e col. (1994) Biodegradation of hyaluronic acid derivatives by hyaluronidase. *Biomaterials*, 15: 359-365.
- Zhou G., Sun Y., Xin H., Zhang Y., Li Z. e col. (2004) In vivo antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacological Research*, 50: 47-53.

Polisacáridos de origen marino como excipientes farmacéuticos en la fabricación de medicamentos

M. Magdalena Echezarreta López, Mariana Landín*

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago. Campus Vida, 15782, Santiago de Compostela, España.

*m.landin@usc.es

Resumen

Este capítulo aborda el papel protagonista de los excipientes farmacéuticos en la obtención de medicamentos estables, seguros y eficaces, así como la necesidad de introducir nuevos materiales. Los océanos son fuentes renovables y poco exploradas de recursos beneficiosos de todo tipo, entre los que se encuentran los polisacáridos. Su atoxicidad, bioactividad, biodegradabilidad, y capacidad de presentar ligandos de unión a receptores celulares, les convierte en un grupo de moléculas muy atractivo para el desarrollo de sistemas farmacéuticos de última generación, especialmente dirigidos a dianas terapéuticas. Se señalan algunos ejemplos de aplicación de estos polisacáridos.

1. Introducción

La introducción de formas farmacéuticas de fabricación industrial a principios del siglo XX, tuvo como consecuencia una modificación profunda de los medicamentos empleados en la práctica clínica. La elaboración de formas de dosificación, resultado de la transformación tecnológica de mezclas más o menos complejas de principios activos y excipientes, afrontó nuevos retos asociados a la necesidad de incrementar la estabilidad de los preparados, a la uniformidad y la velocidad requeridas

en los procesos, o a la introducción de un numeroso arsenal de fármacos químicos.

Históricamente se asignaba un rol pasivo, y por tanto secundario, a los excipientes, a los que se les denominaba sustancias auxiliares. Se consideraba que tenían que ser productos inertes, sin toxicidad ni actividad terapéutica alguna, que cumplieran con la misión de funcionar como vehículos, dotando a la dosis de fármaco, del volumen y la consistencia necesarios para su administración. Sobre esta base, no es de extrañar que a menudo se acudiese al empleo de sustancias naturales, de seguridad ampliamente contrastada (Pifferi y Restani, 2003).

En los años 60, como consecuencia del desarrollo de una nueva ciencia que se denominó Biofarmacia, se evidenció la importante repercusión del proceso de cesión del principio activo a partir de la forma farmacéutica, sobre la eficacia terapéutica y los efectos secundarios de los medicamentos (Figura 1). La Biofarmacia se fundamenta en el estudio de la biodisponibilidad de los fármacos, entendida ésta como la cantidad de fármaco que se absorbe tras la administración de un medicamento y la velocidad con la que sucede ese proceso. Solamente la fracción de la dosis de fármaco que se ha liberado en el momento y lugar adecuados, es capaz de llegar a la sangre y producir un efecto farmacológico. Esta aproximación explicó en su momento las diferencias de efectividad de formulaciones supuestamente intercambiables, elaboradas con idénticas dosis de fármaco y abrió la puerta a la posibilidad de modular la respuesta farmacológica, modificando el proceso de cesión.

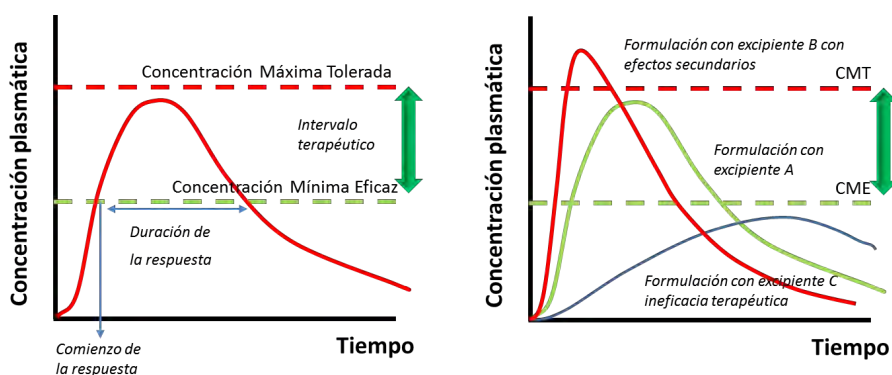


Figura 1. (A) Representación de la concentración plasmática de fármaco frente al tiempo tras la administración de un comprimido por vía oral y (B) perfiles plasmáticos correspondientes a tres formulaciones elaboradas con la misma dosis de fármaco y tres excipientes diferentes.

Hoy en día, las formas farmacéuticas se conciben como sistemas capaces de ceder la cantidad correcta de fármaco a la velocidad adecuada. Incluso, en algunos casos se les exige que dirijan selectivamente el fármaco a un órgano concreto o a determinados receptores celulares seleccionados como dianas terapéuticas. Como consecuencia de este cambio de concepto, los excipientes han pasado de ser considerados materiales inertes a sustancias funcionales, adquiriendo un papel protagonista en las formulaciones. Así, su adecuada selección es el aspecto que condiciona en primer término la calidad de los medicamentos.

Del interés creciente por el desarrollo de los nuevos sistemas farmacéuticos, en particular de las formas de cesión modificada, surgió la necesidad de disponer de excipientes adecuados, capaces de responder a requerimientos cada vez más precisos. El catálogo de excipientes disponibles fue reevaluado bajo este nuevo prisma. A los materiales tradicionalmente empleados en el ámbito farmacéutico, se unieron nuevos productos procedentes de la industria alimentaria, y por lo tanto, seguros desde el punto de vista regulatorio, además de las modificaciones estructurales de otros ya conocidos. También se procedió a explorar el potencial de nuevos compuestos, que por sus características químicas, físicas y físico-químicas pudiesen cumplir los requerimientos de funcionalidad, seguridad y calidad exigibles a los excipientes farmacéuticos.

Los océanos son fuentes renovables y poco exploradas de recursos beneficiosos de todo tipo. De ellos se obtienen desde sustancias con actividad terapéutica como antibióticos, agentes antitumorales, vitaminas, toxinas y antitoxinas,... hasta materiales con interés como excipientes farmacéuticos por sus peculiares propiedades. La abundante y variada fauna y flora (algas) marinas presentan contenidos importantes de un grupo de materiales, los polisacáridos, de gran interés para el desarrollo de los nuevos sistemas farmacéuticos.

Los polisacáridos naturales son polímeros tradicionalmente empleados en la elaboración de formas farmacéuticas. Celulosas, almidones, goma guar, goma tragacanto, goma xantana,... se emplean con diversas funciones (diluyentes, disgregantes, aglutinantes, viscosizantes, espesantes, etc.) en un importante número de formas de dosificación clásicas.

En los últimos años se ha generado un interés creciente por los polisacáridos naturales debido a su falta de toxicidad (incluso a dosis elevadas), su biodegradabilidad y al descubrimiento de otros aspectos relacionados con las funciones para las que han sido diseñados por la naturaleza. Son materiales bioactivos y con capacidad de presentar ligandos de unión a receptores celulares, lo que les convierte en un grupo de moléculas muy atractivo para el desarrollo de sistemas de última generación, especialmente dirigidos a dianas terapéuticas (Khan y col., 2014).

Polisacáridos de origen marino como el quitosano, el alginato, los carragenanos o el fucoídano han sido objeto de una nutrida e importante investigación, que ha dado lugar a la comercialización de productos farmacéuticos novedosos. A continuación se recogen diversos aspectos de ellos que permiten esta aplicación.

2. Quitosano

Las bases de datos biomédicas recogen numerosos estudios científicos sobre el quitosano realizados en los últimos veinte años (Figura 2), con importante incidencia en el ámbito del desarrollo de formulaciones.

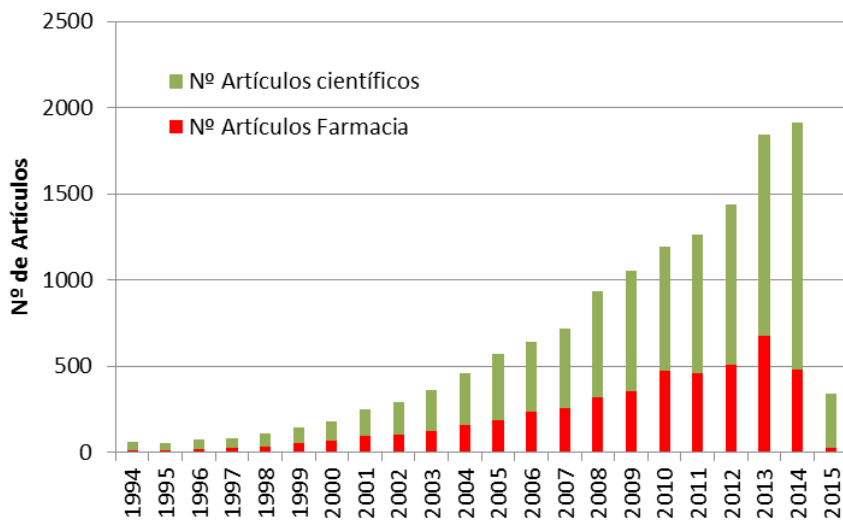


Figura 2. Publicaciones científicas sobre quitosano indexados por la base de datos Pubmed (US National Library of Medicine) en los últimos 20 años.

El quitosano es un polímero lineal que se encuentra en los caparazones de crustáceos y moluscos marinos entre otras fuentes. Es la forma parcial o completamente deacetilada de la quitina. Los quitosanos comercializados presentan un peso molecular entre 10 y 1000 kDa y un grado de deacetilación entre el 40 y el 95%. Ambos parámetros condicionan sus propiedades.

En general, se ha demostrado que es un producto sin toxicidad, biodegradable, biocompatible y biofuncional, que acelera la coagulación sanguínea y los procesos de cicatrización. Presenta, además, capacidad de formación de películas, interesantes propiedades reológicas, mucoadhesivas y promotoras de la absorción de fármacos.

Al contrario de su precursor, la quitina, de elevada insolubilidad acuosa, el quitosano es soluble en medio ácido por su carácter catiónico.

Desde un punto de vista estructural es similar a la celulosa. La diferencia entre ambos radica en el grupo amino (-NH₂) en la posición C2 en el quitosano, en vez del grupo hidroxilo (-OH) de la celulosa (Figura 3). Esta modificación le confiere la capacidad de cargarse positivamente e interactuar mediante enlaces iónicos con otras moléculas de carga negativa como lípidos, colesterol, metales ionizados, proteínas u otras macromoléculas

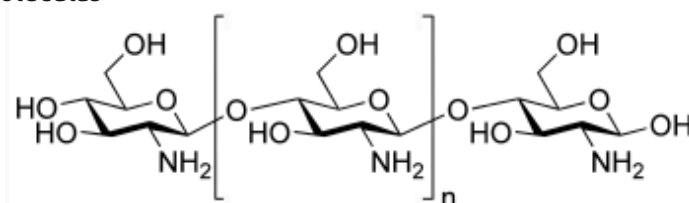


Figura 3. Estructura química del quitosano.

El quitosano tiene actividad terapéutica propia. Se ha demostrado que la ingesta de este polisacárido durante 12 semanas por pacientes con insuficiencia renal crónica contribuye a reducir sus niveles de urea, creatinina y colesterol. Asimismo, por su actividad hemostática y antiinflamatoria, se han propuesto como componente de apósitos. Ciertos quitosanos aceleran la reparación cutánea y previenen las infecciones asociadas a heridas, mediante complejas series de procesos bioquímicos regulados por mediadores de la inflamación (Kumar y col., 2004, Aam y col., 2010).

La literatura científica sobre las potenciales aplicaciones del quitosano para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas es extremadamente amplia. Como puede deducirse de la observación de la Tabla 1 (Kumar y col., 2004) se ha explorado su utilidad como excipiente de comprimidos con diferentes funciones: diluyente de compresión directa, aglutinante en compresión previa granulación y formador de matrices de cesión controlada de fármacos como la prednisolona o el diclofenaco. Su naturaleza iónica contribuye a su interacción con los fármacos, y determina las características de cesión de las formulaciones elaboradas, que resultan pH dependientes en grado variable en función del porcentaje de deacetilación del quitosano.

Se han encontrado también interesantes propiedades bioadhesivas mediante su combinación con otros materiales como el alginato o el ácido etilendiaminotetraacético en comprimidos de compresión directa, con importantes repercusiones sobre la absorción de algunos fármacos como el diltiazem o proteínas y péptidos administrados por vía oral (Bernkop-Schnürch y Scerbe-Saiko, 1998).

Su capacidad filmogénica se ha aplicado a la elaboración de comprimidos recubiertos. Dispersiones de quitosano y colorantes solubles aniónicos dan lugar a cubiertas de apariencia correcta, sin migración de color y cuya disolución es pH dependiente.

Las propiedades mucoadhesivas del quitosano constituyen el fundamento de su empleo en el desarrollo de comprimidos bucales. Así, se elaboraron comprimidos de clorhexidina con micropartículas de quitosano, alginato y manitol, observándose una mejora significativa en el tratamiento de la infección fúngica por *Candida albicans* debido a la cesión prolongada del fármaco en la cavidad bucal.

La administración de fármacos de forma selectiva en el colon, constituye una buena aproximación para el tratamiento de las enfermedades intestinales, como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn o el cáncer de colon, de amplia incidencia en el mundo más desarrollado. Además, se ha descubierto la potencialidad de esta zona como de absorción sistémica de proteínas y péptidos, ya que no presenta las condiciones de pH extremo del estómago y de las enzimas digestivas del intestino delgado, a la vez que ofrece dos ventajas interesantes, un elevado tiempo de permanencia y una flora

colónica, que fundamentalmente se alimenta de polisacáridos (Andrade y col., 2011). La utilidad del quitosano para el desarrollo de formas orales de cesión colónica se ha explorado sobre la base de que este polisacárido puede ser degradado por lipasas, pectinasas y amilasas no específicas, procedentes de la flora colónica. Los mejores resultados se obtienen con formas farmacéuticas de quitosano recubiertas por polímeros sintéticos que lo protegen de las condiciones ácidas y enzimáticas de las zonas superiores (Gulbake y Jain, 2012). Cuando alcanzan la porción del colon, el quitosano queda expuesto a las enzimas bacterianas que lo degradan dando lugar a quitoooligómeros de pequeño tamaño molecular con actividad bifidogénica y a la liberación del principio activo. Sobre esta base se han probado formulaciones del corticoide, prednisolona o de la insulina, demostrándose mejoras en la absorción de ambos fármacos por esta vía (Kumar y col., 1999, Park y col., 2002).

Tabla 1. Usos del quitosano en formulaciones farmacéuticas (Kumar y col., 2004)

Diluyente de compresión directa en comprimidos
Aglutinante para granulación vía húmeda en comprimidos, granulados o pelets
Matriz de liberación controlada
Disgregante de comprimidos
Excipiente para liberación en zonas específicas (estómago, colon...)
Polímero bioadhesivo y promotor de la absorción por vía ocular
Agente viscosizante en hidrogeles y soluciones orales
Humectante de fármacos poco solubles
Promotor de la absorción en formas nasales u orales
Excipiente portador de vacunas o material genético
Polímero biodegradable en implantes
Excipiente de elaboración de sistemas microparticulares y nanoparticulares
Excipiente mucoadhesivo de formas de administración sobre diferentes mucosas (bucal, vaginal...)

El quitosano también ha sido objeto de investigación para el desarrollo de formulaciones para la vía nasal con el fin de mejorar la biodisponibilidad,

la seguridad y la eficacia de algunos fármacos hidrofílicos como péptidos y proteínas, para los cuales la vía oral no es una buena alternativa. La actividad mucodhesiva de los quitosanos, unida a su capacidad para comportarse como promotores de la absorción, particularmente de aquellos de bajo grado de acetilación (1-5%), les convierte en adecuados candidatos para el desarrollo de formulaciones nasales, ya que incrementan el tiempo de permanencia en la nariz y la permeabilidad de las membranas celulares de la zona (Chen y col, 2013, Benediktsdóttir y col, 2014). Así, se han desarrollado disoluciones, polvos de inhalación y sistemas coloidales (suspensiones de micropartículas y nanopartículas) con quitosano solo o en combinación con otros polímeros para la administración de vacunas (influenza, tosferina...), antibióticos (gentamicina), hormonas (calcitonina, insulina...), etc. (Casettari y Illum, 2014).

La elevada viscosidad de las dispersiones de quitosano y particularmente su comportamiento viscoelástico y pseudoplástico han favorecido el desarrollo de preparaciones oftálmicas con estos materiales ya que incrementan el tiempo de permanencia de la formulación sobre la córnea, a la vez que evitan una modificación inconveniente de las características del fluido lacrimal (Başaran y Yazan, 2012). Además, sus propiedades bioadhesivas contribuyen a su mayor interacción con la superficie corneal y, por lo tanto, a la mayor efectividad del tratamiento.

Los quitosanos son aceptablemente bien tolerados por vía parenteral. Por ello, se han propuesto como excipientes base para la elaboración de geles de inyección subcutánea y liberación controlada de fármacos como el sulfato de morfina, o la inyección intramuscular de microsferas cargadas con progesterona u otros fármacos antitumorales (mitoxantrone, cis-platino,...). Mediante la inyección de moléculas de quitosano fluorescentes, se ha demostrado su elevada biodegradabilidad por esta vía. Sus fragmentos, de reducido peso molecular, son excretados fácilmente por orina. Además, puede modularse su distribución y tiempo de permanencia en sangre mediante la modificación de la molécula con diferentes radicales, como el grupo succinilo (Carreño-Gómez y Duncan, 1997).

Los quito-oligosacáridos, producidos por degradación enzimática o métodos químicos a partir del quitosano, presentan también una prometedora perspectiva ya que su bioactividad se ha relacionado con

su potencial uso como vectores de genes, inhibición de crecimiento de tumores y procesos inflamatorios (asma), propiedades antifúngicas, antibacterianas o antiparasitarias (malaria) o con actividad hemostática cuando se emplean en el tratamiento de heridas.

3. Alginato

El alginato es un polímero natural, biodegradable y biocompatible, obtenido a partir de algas marrones (*Phaeophyceae*) como sal, con cloruro cálcico o sódico mediante extracción, filtración y precipitación. Las sales de alginato se pueden transformar en ácido algínico mediante el tratamiento con ácido clorhídrico, después de un proceso de purificación y conversión para dar lugar a un polvo soluble en agua (Lee y Mooney, 2012).

El carácter polianiónico de los alginatos es debido a los grupos carboxilo presentes a lo largo de su cadena. La estructura del alginato es la de un copolímero lineal compuesto por unidades de (1,4)- β -D-ácido manurónico y residuos de ácido (1,4) α -L-gulurónico (Figure 4). La proporción de los monosacáridos que lo conforman y la longitud de las cadenas determinan su peso molecular (entre 32000–400000) y sus propiedades físicas (Lee y Mooney, 2004). Se han comercializado hasta 200 variedades de alginatos diferentes.

Las sales de ácido algínico están formadas por tres tipos de bloques que pueden ser de manurónico (M), de gulurónico (G) o combinación de ambos (MG). En dispersión acuosa las regiones de bloques M son cadenas lineales, mientras que los bloques G presentan una estructura en forma de bucle. Cuando dos cadenas de bloques G se alinean lado a lado resulta un hueco en forma de diamante, con las dimensiones ideales para acomodar un ión en su interior y formar una estructura dimérica (Figura 4). Así, el alginato puede interaccionar con iones de calcio, plomo, cobre, bario, estroncio, cobalto, níquel, zinc o manganeso, dando lugar a geles por reticulación iónica. Las propiedades de los geles formados (resistencia mecánica, capacidad de hinchamiento y características de estabilidad) dependen del ión utilizado, el número de enlaces formados y la longitud y rigidez de los bloques que constituyen las moléculas de alginato (Qin, 2008, Jeon y col., 2009, Pasín y col., 2012, Avendaño-Romero y col., 2013, Gómez-Ordóñez, 2013).

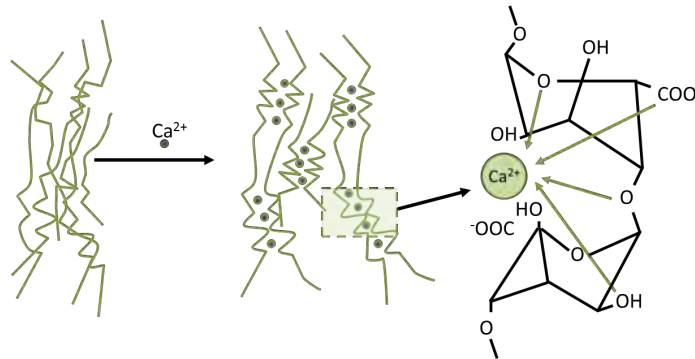


Figura 4. Cambios conformacionales sufridos por las cadenas de alginato en presencia de iones divalentes como el calcio. La estructura ha sido descrita como modelo de gelificación en "caja de huevos".

En general, las aplicaciones del ácido algínico y sus sales en el ámbito farmacéutico, dependen de sus propiedades como espesante, formador de geles y estabilizante. Así, han sido empleados en diversas formulaciones clásicas: diluyentes y disgregantes en comprimidos, espesantes y agentes suspensores en geles, lociones y cremas, o estabilizantes en emulsiones; pero sin duda su proyección futura se enmarca en el diseño de formas de cesión modificada de fármacos. La formación de sistemas de alginato en los que se encuentran embebidas moléculas o partículas de fármaco es el fundamento de estas formas farmacéuticas. Al contacto con un medio acuoso, la rápida hidratación de los alginatos da lugar a la formación instantánea de un hidrogel de espesor y viscosidad variables que limita la movilidad de las moléculas de fármaco, regulando su cesión.

Los alginatos han sido propuestos para la elaboración de sistemas reservorio en los que existe un núcleo de fármaco rodeado por una cubierta de alginato de espesor variable y de permeabilidad característica, o sistemas matriciales, en los que el fármaco se encuentra homogéneamente distribuido entre las cadenas del polímero.

Se ha demostrado que la microencapsulación de fármacos como la teofilina permite regular su cesión por difusión mediante el espesor de la cubierta, de manera que es posible obtener incluso perfiles de liberación constantes, y en algunos casos, como en el de la indometacina, conseguir la reducción de sus efectos secundarios (irritación mucosa intestinal).

Cuando el fármaco se formula en forma de matriz de alginato, su proceso de cesión es más complejo, ya que implica procesos de hidratación, hinchamiento, disolución/erosión y difusión sucesivos. El hinchamiento de los alginatos reticulados es muy dependiente del pH del entorno por lo que este mecanismo se ha utilizado como base para el desarrollo de formas de liberación modulada por pH. En condiciones ácidas (p. ej. estómago), el alginato reticulado apenas se altera, y la cesión del fármaco se produce por difusión a través de una matriz insoluble. Sin embargo, en un medio neutro-básico (p. ej. intestino), las cadenas de alginato se hidratan y el proceso de cesión se lleva a cabo mediante un proceso de hinchamiento y erosión/difusión. En este caso, la liberación del fármaco se ralentiza proporcionalmente a la concentración de polímero en la formulación y a la fracción de gulurónico en el alginato (Østberg y col., 1993). El ácido gulurónico incrementa el grado de coordinación del alginato con los iones divalentes y la rigidez de la cadena polimérica, reduciendo su capacidad de hinchamiento y la facilidad para la erosión. Por el contrario, en general, cuando se incrementa la fracción de manurónico, los geles de alginato presentan mayor elasticidad y menor capacidad para modular la cesión de fármaco, excepto si este presenta afinidad química por estos grupos, como se ha demostrado para algunos medicamentos de carácter catiónico como el sulfato de gentamicina o la lidocaina.

El peso molecular del alginato y la viscosidad que confiere al medio acuoso, así como el grado y tipo de ión utilizados en su reticulación son también propiedades que contribuyen a la modulación de la cesión de algunos fármacos, como el pindolol o la nicardipina, y su adecuada caracterización constituye un elemento clave en el diseño de formas farmacéuticas elaboradas con este producto (Tønnesen y Karlsen, 2002).

Los alginatos han demostrado también una excelente capacidad bioadhesiva, ya que por su carácter polianiónico son capaces de interaccionar con la mucina que protege las superficie epiteliales (Pinkas y Zilberman, 2014). Esta propiedad les hace especialmente interesantes para la producción de formas bioadhesivas de administración vaginal, bucal o incluso oral, que por su adherencia a la mucosa son capaces de quedar retenidas sobre ésta y ceder fármaco localmente de forma prolongada.

Estos productos son empleados también en la elaboración de apósitos como material pulverulento, films o películas, mediante el secado de una dispersión de alginato, solo o en combinación con otros polímeros (p. ej. carboximetilcelulosa), o bien como cintas flexibles, más indicadas para rellenar cavidades. Estos apósitos presentan una buena capacidad de absorción de exudados, dando lugar a la formación de gel que limita la formación de nueva secreción y minimiza la contaminación bacteriana (Boateng y col., 2010).

Algunas de las peculiares características de los alginatos, les hacen especialmente adecuados para albergar elementos extremadamente lábiles como ADN, proteínas o células. Los procesos de gelificación en condiciones acuosas suaves, sin compuestos orgánicos, favorecen la incorporación de biomoléculas y células en estructuras tridimensionales, con actividad biológica completa. La biocompatibilidad y la inmunogenicidad de estos materiales varían en función de factores como la fracción de galurónico y la presencia de potenciales impurezas.

Un importante número de experimentos de microencapsulación de proteínas y DNA con alginatos ha obtenido prometedores resultados por vía oral o nasal para la administración de biomoléculas y el tratamiento de importantes trastornos crónicos como la fibrosis quística, la diabetes o el cáncer (Machado y col., 2013).

4. Fucoïdan

Se denomina Fucoïdan a un grupo de polisacáridos sulfatados que contiene fucosa obtenidos de diversas algas pardas. En función de la especie de alga de la que se obtenga su estructura es variable. En general están constituidos por una cadena lineal de fucosa mediante enlaces (1 → 3) con grupos sulfato en la cadena con diversos tipos y grados de sustitución (Figura 5).

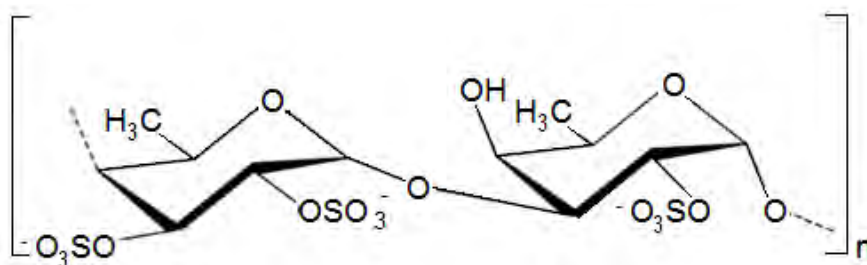


Figura 5. Estructura básica del polisacárido fucoidan.

Sus propiedades bioactivas, potencialmente beneficiosas, pueden variar en función de la fuente vegetal y el proceso de extracción, de su composición y contenido, así como de la distribución de las cargas en la molécula, grado de sustitución de éstas y de su pureza. Su obtención a partir de las macroalgas a nivel industrial, se realiza mediante un proceso complejo en tres fases, que incluye la molienda del material vegetal, la extracción en medio acuoso en caliente en sucesivas etapas, y la precipitación con sales o disolventes orgánicos.

Tanto su peso molecular (13-950 kDa) como sus características de solubilidad y sus propiedades reológicas varían en función de la materia prima de partida (especie, tamaño de alga, condiciones ambientales,...) lo que condiciona extremadamente sus aplicaciones, especialmente en el ámbito farmacéutico.

Aunque hasta el momento el fucoidan ha encontrado el mayor número de aplicaciones en cosmética, se han descrito diversas e interesantes actividades biológicas (antiinflamatoria, antiviral, anticoagulante, antitumoral,...) que le convierten en potencial candidato para nuevas aplicaciones biomédicas. Así, se han combinado con quitosano para el desarrollo de sistemas micro y nanoparticulares sensibles a pH en los que se han formulado, con buenos resultados, material genético y proteínas (Sezer y Akbuğa, 2006, 2009) o anticoagulantes como la heparina, ya que potencia su acción antitrombótica. Se ha propuesto el empleo de mezclas fucoidan, chitosano y alginato para el desarrollo de apósitos superabsorbentes que facilitan el curado en húmedo de las heridas, evitando el exceso de fluidos y la maceración, y promoviendo la regeneración de los tejidos (Murakami y col., 2010).

5. Carragenatos

Carragenatos es el nombre genérico de origen irlandés, de un grupo de polisacáridos sulfatados que se obtienen de especies de algas rojas de la familia de las *Rhodophyceae*. Se comercializan como sales de diferentes cationes, sodio, potasio y calcio, o mezclas de estas. Son empleados en alimentación, en cantidades importantes, como estabilizantes, gelificantes y emulsificantes, por su atoxicidad y seguridad.

Desde el punto de vista químico, son polímeros lineales formados por unidades de galactosa y/o de anhidrogalactosa, sulfatadas o no, unidas por enlaces alternos $\alpha(1-3)$ y $\beta(1-4)$. Su peso molecular oscila entre 300.000 y 400.000. La variación en el grado de sulfatación y el número de unidades de anhidrogalactosa da lugar a estructuras diversas con propiedades y comportamientos distintos (Figura 6).

Industrialmente, se obtienen mediante maceración en medio acuoso, alcalinizado y en caliente, de las algas trituradas, seguido de filtración y precipitación por adición de disolvente orgánico. El lavado repetido con mezclas hidroalcohólicas y su posterior secado, da lugar a la obtención del carragenato que presenta diferentes estructuras en función del material vegetal de partida. En el ámbito farmacéutico, los carragenatos kappa κ - (monosulfatado), iota ι - (disulfatado), y lambda λ - (trisulfatado) son los más empleados (Figura 6) (Li y col., 2014, Ahmed y col, 2014).

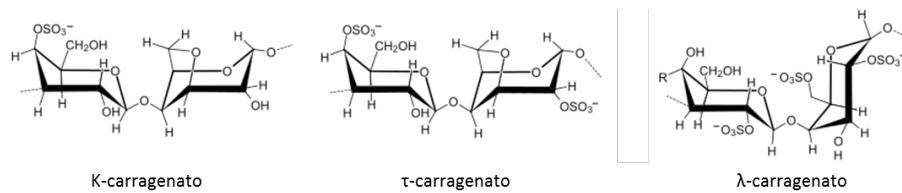


Figura 6. Estructura básica de los diferentes tipos de carragenatos empleados en farmacia.

La funcionalidad de los carragenatos radica fundamentalmente en sus propiedades reológicas. En general, las dispersiones de carragenatos son soluciones viscosas, cuya viscosidad depende, además de su naturaleza y su peso molecular, de su concentración en el medio, de la temperatura y de la presencia de otros solutos en el medio. La viscosidad es directamente proporcional a la concentración, como consecuencia de su naturaleza lineal cargada. Algunos carragenatos pueden formar geles. La viscosidad decrece con el incremento de temperatura. Este proceso es reversible

siempre que no se supere la temperatura crítica a la cual el carragenato se degrada o el calentamiento no sea extremadamente prolongado.

El κ - y el ι - carragenato son capaces de formar geles de características diferentes. Mientras que los geles de κ -carragenato son rígidos y frágiles, los de ι -carragenato son blandos y elásticos. El λ -carragenato no da lugar a estructuras gelificadas, salvo por reticulación catiónica.

Las propiedades funcionales descritas para los carragenatos son de gran aplicación para la elaboración de formas de dosificación (Figura 7).

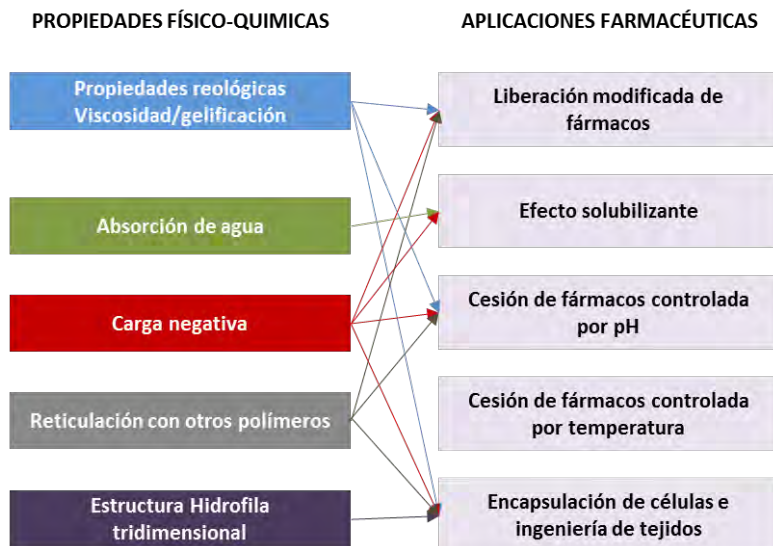


Figura 7. Relación entre las propiedades físico-químicas funcionales de los carragenatos y sus potenciales aplicaciones farmacéuticas.

Como agentes gelificantes, es posible su utilización en la elaboración de formas semisólidas (cremas y geles) de diferentes texturas. Así, se han desarrollado geles de aplicación vaginal con anticonceptivos, cuyas características reológicas facilitan la permanencia local e incrementan la eficacia del preparado. En esta línea, también se han desarrollado geles para la prevención de enfermedades de transmisión sexual como el virus del SIDA, el virus del papiloma humano o la gonorrea, con resultados muy prometedores en los ensayos clínicos en fase III (Gupta y col., 2011). En los últimos años los investigadores han estudiado las interacciones polímero-fármaco, como una herramienta potencial para el diseño de formulaciones de liberación controlada. En este sentido, los carragenatos resultan

excelentes ejemplos, ya que su naturaleza polianiónica les permite la interacción con fármacos catiónicos. Así, el λ -carragenato por presentar un mayor número de cargas ha resultado más eficiente que κ - o el ι - en el control de la liberación de fármacos hidrosolubles. Esta aproximación ha resultado útil en el desarrollo de comprimidos matriciales, pellets e hidrogeles de cesión modificada (De Robertis y col., 2015).

Como ya se ha señalado anteriormente, estos polímeros se emplean en combinación con otros como el quitosano, el alginato, galacto- y gluco-mananos, almidones o derivados celulósicos. Así por ejemplo, con el quitosano forma mezclas polielectrolíticas complejas útiles en la obtención de comprimidos de liberación controlada, como se ha demostrado con teofilina o diltiazem.

La reticulación de estas combinaciones con glutaraldehído permiten obtener pellets de cesión colónica para un tratamiento local de la zona o sistemas flotantes de cesión en el estómago con actividad antiulcerosa, eficaces frente al *Helicobacter pylori* (Awad y col., 2010).

6. Conclusiones

Este capítulo se ha centrado fundamentalmente en poner de manifiesto la importancia cualitativa y cuantitativa de un pequeño grupo de polisacáridos marinos ampliamente estudiado y aplicado hasta el momento en el desarrollo de formas farmacéuticas tradicionales y novedosas. Sin embargo, la introducción de los cuatro polisacáridos señalados no es más que una pequeña fracción del potencial que los fondos marinos presentan. La diversidad de estructuras aún no descubiertas y la posibilidad de modificación de las conocidas abren un espectacular universo para la investigación científica en el ámbito de la Farmacia.

Referencias bibliográficas

- Aam B. B., Heggset E. B., Norberg A. L., Sørli M., Vårum K. y col. (2010) Production of chitoooligosaccharides and their potential applications in Medicine. *Marine Drugs*, 8 (5): 1482-1517.
- Ahmed A., Adel M., Karimi P., Peidayesh M. (2014) Pharmaceutical, cosmeceutical and traditional applications of marine carbohydrates. *Advances in Food Nutrition Research*, 73: 197-220.

- Andrade F., Antunes F., Nascimento A. V., da Silva S. B., das Neves J. y col. (2011) Chitosan formulations as carriers for therapeutic proteins. *Currents in Drug Discovery and Technology*, 8 (3): 157-172.
- Avendaño-Romero G. C., López-Malo A., Palou E. (2013) Propiedades del alginato y aplicaciones en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 7(1): 87-96.
- Awad G. A. S., Mortada N. D., Kamel A. O. Elshafeey, A. H. (2010) Marine derived polysaccharides as drug delivery systems. En: *Polysaccharides: development, properties and applications*, Tiwari A. (ed.). Nova Science Publishers Inc., Nueva York. 17-62 p.
- Başaran E., Yazan Y. (2012) Ocular application of chitosan. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 9 (6): 701-712.
- Benediktssdóttir B. E., Baldursson Ó., Másson M. (2014) Challenges in evaluation of chitosan and trimethylated chitosan (TMC) as mucosal permeation enhancers: from synthesis to in vitro application. *Journal of Controlled Release*, 173 (1): 18-31.
- Bernkop-Schnürch A., Scerbe-Saiko A. (1998) Synthesis and in vitro evaluation of chitosan-EDTA-protease-inhibitor conjugates which might be useful in oral delivery of peptides and proteins. *Pharmaceutical Research*, 15 (2): 263-269.
- Boateng J. S., Auffret A. D., Matthews K. H., Humphrey M. J., Stevens H. N. y col. (2010) Characterisation of freeze-dried wafers and solvent evaporated films as potential drug delivery systems to mucosal surfaces. *International Journal of Pharmaceutics*, 389 (1): 24-31.
- Carreño-Gómez B., Duncan R. (1997) Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 148 (2): 231-240.
- Casettari L., Illium L. (2014) Chitosan in nasal delivery systems for therapeutic drugs. *Journal of Controlled Release*, 190 (9): 189-200.
- Chen Y., Wang M., Fang L. (2013) Biomaterials as novel penetration enhancers for transdermal and dermal drug delivery systems. *Drug Delivery*, 20 (5): 199-209.
- De Robertis S., Bonferoni M. C., Elviri L., Sandri G., Caramella, C. y col. (2015) Advances in oral controlled drug delivery: the role of drug-polymer and interpolymer non-covalent interactions. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 12 (3): 441-453.
- Fernández-Farrés, I., Norton, I. T. (2014) Formation kinetics and rheology of alginate fluid gels produced by in-situ calcium release. *Food Hydrocolloids*, 40: 76-84.
- Gulbake A., Jain S. K. (2012) Chitosan: a potential polymer for colon-specific drug delivery system. *Expert Opinion in Drug Delivery*, 9 (6): 713-729.
- Gupta S., Gabrani R., Ali J., Dang S. (2011) Exploring novel approaches to vaginal drug delivery. *Recent Patent in Drug Delivery and Formulation*, 5 (2): 82-94.
- Jeon O., Bouhadir K. H., Mansour J. M., Alsberg E. (2009) Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 30 (14): 2724-2734.

- Khan W., Challa V. G. S., Langer R., Domb A. J. (2014) Biodegradable polymers for focal delivery systems. En: Focal controlled drug delivery, Domb A. J., Khan W (eds.). CRS Springer, Nueva York. 3-32 p.
- Kumar G., Smith P. J., Payne G. F. (1999) Enzymatic grafting of a natural product onto chitosan to confer water solubility under basic conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 63 (2): 154-165.
- Kumar M. N., Muzzarelli R. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., Domb A. J. (2004) Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, 104 (12): 6017-6084.
- Lee K. Y., Mooney D. J. (2012) Alginate: properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37 (1): 106-126.
- Li L., Ni R., Shao Y., Mao S. (2014) Carrageenan and its applications in drug delivery. *Carbohydrate Polymers*, 103 (15): 1-11.
- Liu J., Zhan X., Wan J., Wang Y., Wang C. (2015) Review for carrageenan-based pharmaceutical biomaterials: favourable physical features versus adverse biological effects. *Carbohydrate Polymers*, 121 (5): 27-36.
- Machado A. H., Lundberg D., Ribeiro A. J., Veiga F. J., Miguel M. G. y col. (2013) Encapsulation of DNA in macroscopic and nanosized calcium alginate gel particles. *Langmuir*, 29 (51): 15926-15935.
- Murakami K, Aoki H, Nakamura S, Nakamura S. I., Takikawa M. y col. (2010) Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 31 (1): 83-90.
- Østberg T., Vesterhusa L., Graffnera, C. (1993) Calcium alginate matrices for oral multiple unit administration: II. Effect of process and formulation factors on matrix properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 97 (1-3): 183-193.
- Park H. S., Lee J. Y., Cho S. H., Baek H. J., Lee S. J. (2002) Colon delivery of prednisolone based on chitosan coated polysaccharide tablets. *Archives of Pharmacal Research*, 25 (6): 964-968.
- Pasín B. L., Azón C. Garriga A. (2012) Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1): 130-151.
- Pifferi G., Restani P. (2003) The safety of pharmaceutical excipients. *Il Farmaco*, 58 (8): 541-550.
- Pinkas O., Zilberman M. (2014) Effect of hemostatic agents on properties of gelatin-alginate soft tissue. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25 (6): 555-573.
- Quin, Y. (2008) Alginate fibres: an overview of the production processes and applications in wound management. *Polymer International*, 57 (2): 171-180.
- Sezer A. D., Akbuğa J. (2006) Fucosphere--new microsphere carriers for peptide and protein delivery: preparation and in vitro characterization. *Journal of Microencapsulation*, 23 (5): 513-522.

- Sezer A. D., Akbuğa J. (2009) Comparison on in vitro characterization of fucospheres and chitosan microspheres encapsulated plasmid DNA (pGM-CSF): formulation design and release characteristics. *AAPS PharmSciTech*, 10 (4): 1193-1199.
- Tønnesen H. H., Karlsen J. (2002) Alginate in drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(6): 621-30.

Agradecimentos/Agradecimientos

Os coordenadores deste livro gostariam de agradecer o apoio financeiro do FEDER através do Programa Operacional de Cooperação Transfronteiriça Espanha Portugal 2007-2013 (POCTEP) no âmbito do projeto 0687_NOVOMAR_1_P.

Los coordinadores de este libro desean agradecer el apoyo financiero FEDER a través del programa Operacional de Cooperación Transfronteriza España-Portugal 2007-2013 (POCTEC) en el ámbito del proyecto 0687_NOVOMAR_1_P.

