

**LUDMILA ALVES RODRIGUES**

**PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA  
NA PRODUÇÃO DE VACINAS**

Belo Horizonte, 2015.

Ludmila Alves Rodrigues

Perspectivas da utilização de nanopartículas de quitosana na produção de vacinas

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Farmacologia.

Orientadora: Regina Maria De Marco Turchetti Maia

Instituto de Ciências Biológicas

UFMG

Belo Horizonte, 2015.

043 Rodrigues, Ludmila Alves.

Perspectivas da utilização de nanopartículas de quitosona na produção de vacinas [manuscrito] / Ludmila Alves Rodrigues. - 2015.

44 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Regina Maria De Marco Turchetti Maia.

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Farmacologia.

1. Quitosana - Teses. 2. Vacinas - Teses. 3. Adjuvantes farmacêuticos. 4. Biocarreador. 5. Nanopartículas. 6. Farmacologia - Teses. I. Turchetti-Maia, Regina Maria De Marco. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615

# "PERSPECTIVAS DA UTILIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANA NA PRODUÇÃO DE VACINAS"

**LUDMILA ALVES RODRIGUES**

Monografia de Especialização defendida e aprovada, no dia **23 de fevereiro de 2015**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. ALFREDO MIRANDA DE GÓES**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. REGINA MARIA TURCHETTI MAIA**  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADORA

Curso de Especialização em Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 23 de fevereiro de 2015**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por cada oportunidade que tive ao longo da vida e pela força diária que me permitiu alcançar mais esta conquista.

Aos eternos e verdadeiros amigos Franklin e Ismael, queridos mentores e “anjos da guarda”, a quem jamais terei como retribuir o auxílio constante.

A minha mãe Odete e as minhas irmãs, Cristiane e Fernanda, pelo grande incentivo, apoio e ajuda, especialmente nos momentos de maior necessidade.

Ao meu grande companheiro, Alexandre Mello, que sempre me ajudou e incentivou sem medir esforços, mesmo quando seu auxílio implicava em abrir mão de algo.

Agradeço também a todos os colegas do LIIB, especialmente ao aluno de iniciação científica, Alexandre Lemos, que tanto me ajudou no atual projeto de pesquisa em que trabalho, me permitindo ter tempo suficiente para escrever a presente revisão.

Aos meus colegas de laboratório do LICM, especialmente aos que trabalham ou já trabalharam com o polissacarídeo quitosana, que contribuíram direta ou indiretamente para a reunião dos trabalhos aqui citados.

Ao Prof. Alfredo, meu orientador de mestrado, por cada oportunidade ao longo desses três anos em que trabalho em seu laboratório, pelo constante apoio intelectual e científico e por aceitar o convite de participar da banca desta monografia.

À Profa. Eliane, minha co-orientadora de mestrado, pela força e por todo auxílio e incentivo em tudo se refere a minha trajetória acadêmica e ao meu progresso como pesquisadora.

A todos os professores do Curso de Especialização em Farmacologia pelos inúmeros ensinamentos que adquiri ao longo desse percurso.

Aos colegas de turma, inclusive aqueles que não chegaram a concluir o curso, que tanto contribuíram para o meu aprendizado durante esse período.

Ao Prof. Antônio Carlos, coordenador do Curso de Especialização em Farmacologia, pela atenção, paciência e disponibilidade constantes, pela disposição em nos ouvir e por sempre buscar nos ajudar ao longo de todo o curso.

E finalmente, agradeço à Profa. Regina Maria, minha orientadora neste trabalho, pela paciência e dedicação na correção da monografia e também pela compreensão e apoio nos momentos em que precisei me dedicar aos estudos para o mestrado.

## RESUMO

O desenvolvimento de novas vacinas que sejam estáveis e econômicas, que requerem poucas doses, podendo ser administradas utilizando sistemas livres de agulhas é, sem dúvidas, uma prioridade mundial. Diante dessa necessidade, é primordial que sejam desenvolvidos novos adjuvantes e sistemas de entrega mais eficientes, biocompatíveis e econômicos.

A quitosana tem se mostrado uma opção extremamente promissora tanto como biocarreador quanto como adjuvante. Ela possui biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade, sendo estes os principais motivos de seu sucesso nas variadas áreas em que é utilizada. Outro fator imprescindível para a sua diversidade de atuação é a estrutura química que apresenta, que permite a realização de interações com diferentes grupos funcionais, facilitando a ocorrência de adaptações para se atingir a função desejada. Além disso, também possui ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-alérgica e anti-ulcerogênica, o que amplifica ainda mais o seu campo de atuação.

O polissacarídeo ainda é capaz de formar nanopartículas com facilidade, o que melhora a sua capacidade de absorção, e conseqüentemente, favorece a sua utilização como biocarreador de vacinas. Além disso, também atua acentuando a resposta imune, mostrando-se um potente adjuvante, com valiosas características.

O presente trabalho de revisão reúne diversos estudos que mostram as propriedades e formas de atuação desse versátil biopolímero. Com o propósito de destacar o seu grande potencial e a variedade de aplicação, são apresentadas várias informações sobre o mais importante derivado da quitina.

## **ABSTRACT**

The development of new vaccines that are stable and economical, require few doses and may be administered using free needle systems is undoubtedly a global priority. Given this need, it is essential the development of new adjuvants and more efficient, economic and biocompatible delivery systems.

Chitosan has been shown as an extremely promising option, both as a biocarrier and an adjuvant. It offers biocompatibility, biodegradability and low toxicity, which are the main reasons for their success in various areas in which it is used. Another essential factor for its diverse performance is its chemical structure, which allows the realization of interactions with different functional groups, facilitating the occurrence of adaptation to achieve the desired function. It also has antibacterial, antifungal, antiviral, anti-allergic and anti-ulcerogenic properties, which amplifies even more its acting field.

The polysaccharide is also able to form nanoparticles easily, which improves the absorption capacity, and, therefore, favors its use as a vaccine biocarrier. Furthermore, it also acts accentuating the immune response, as a potent adjuvant with valuable features.

This review brings together several studies that show the properties and forms of action of this versatile biopolymer. In order to highlight its great potential and variety application it will be presented several information of the most important derivative of chitin.

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	5
1.1	Vacinas e seus desafios .....	5
1.2.	Biocarreadores vacinais.....	9
2.	Objetivo geral .....	11
3.	Histórico .....	12
4.	Características da quitina e quitosana.....	14
4.1.	Quitina.....	14
4.2.	Quitosana.....	20
4.2.1.	Características Químicas .....	20
4.2.1.1.	Solubilidade .....	21
4.2.1.2.	Viscosidade.....	22
4.2.1.3.	Peso molecular.....	22
4.2.2.	Propriedades e Aplicações .....	23
4.2.2.1.	Ação antimicrobiana e antifúngica .....	24
4.2.2.2.	Biocompatibilidade e Biodegradabilidade.....	25
4.2.2.3.	Ação anti-inflamatória .....	26
4.2.2.4.	Utilização como biomaterial e ação cicatrizante.....	27
4.2.3.	Formas de preparo.....	29
4.2.3.1.	Fibras e Filmes.....	29
4.2.3.2.	Hidrogéis.....	29
4.2.3.3.	Microesferas .....	29
4.2.3.4.	Nanopartículas .....	30
5.	Perspectivas .....	34
6.	Conclusões.....	36
7-	Referências .....	37

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Vacinas e seus desafios

A vacinação é, indiscutivelmente, uma das intervenções de saúde de baixo custo mais bem sucedidas. Nas últimas décadas, essa intervenção trouxe grandes benefícios para a população mundial, salvando milhares de vidas. Segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (2013), a imunização foi capaz de erradicar a varíola, reduzir em 99% a incidência global de poliomielite e diminuir o número de mortes causadas por diversas doenças, como difteria, tétano, coqueluche, sarampo, gripes causadas por *Haemophilus influenzae* tipo B e meningite meningocócica A, C, W e Y (RAPPUOLI *et al.*, 2014). O estudo realizado em 2013 demonstrou que atualmente as vacinas evitam mais de 2,5 milhões de mortes por ano. Nos últimos 10 anos, houve um considerável avanço no desenvolvimento e na introdução de novas vacinas, com a ampliação do alcance dos programas de imunização. Apesar do aumento do número de crianças nascidas por ano, a combinação da imunização com outros cuidados de saúde e o desenvolvimento de intervenções, como a melhoria do saneamento, higiene e educação reduziu o número anual de mortes entre crianças menores de cinco anos de idade, de 9,6 milhões em 2000 para 7,6 milhões em 2010.

O desenvolvimento de uma vacina apresenta-nos vários desafios, como a busca por sua estabilidade, baixo custo, necessidade de poucas doses, e preferencialmente, administração livre de agulhas, conferindo maior segurança ao público alvo (O'HAGAN e RAPPUOLI, 2004). Existem casos em que mesmo possuindo os antígenos necessários não se consegue desenvolver a vacina objetivada (RAPPUOLI *et al.*, 2014). Um grande desafio para o sucesso de uma vacina é a estratégia de liberação do antígeno a ser empregada. Atualmente, são desenvolvidos e avaliados sistemas com grande potencial, como as diversas técnicas de produção de vacinas que utilizam DNA, plantas transgênicas, adjuvantes, micropartículas e nanopartículas (AZAD e ROJANASAKUL, 2006).

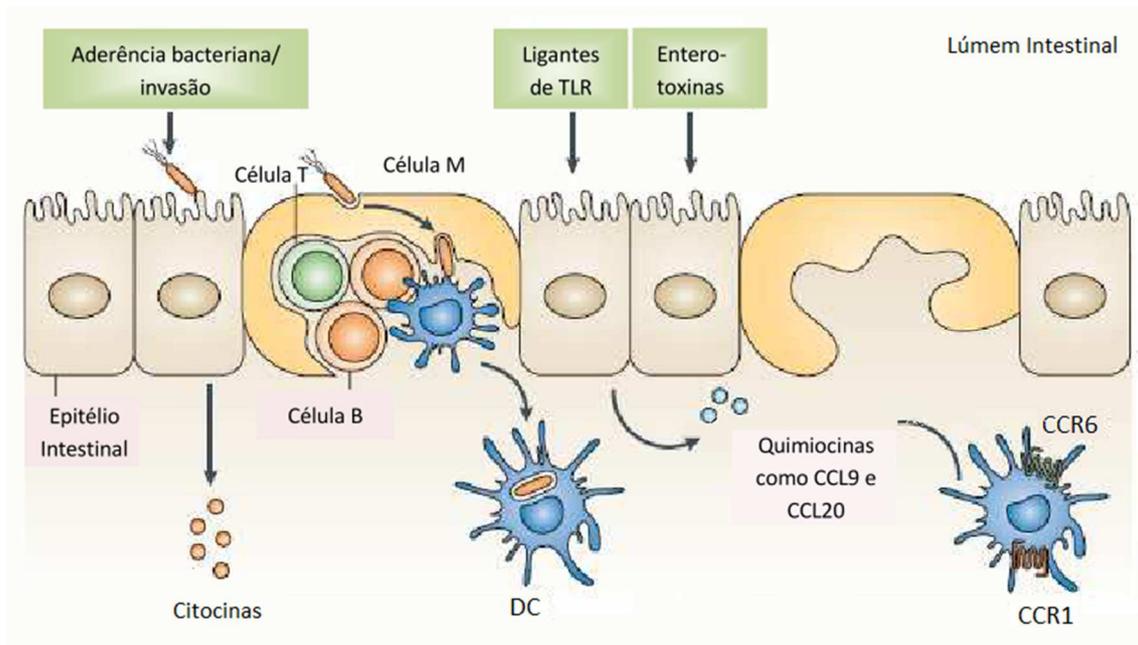
A tendência predominante no desenvolvimento de vacinas neste início do século XXI tem sido a utilização de vias alternativas para sua administração. As vias parenterais, capazes de induzir uma resposta imune sistêmica por células B e T do sangue, tem sido as mais utilizadas (PLOTKIN, 2005). Em contrapartida, as utilizações dessas vias aumentam a necessidade de treinamento dos profissionais de saúde e de equipamentos

estéreis, o que eleva os gastos das campanhas de vacinação (BORGES, 2007), além de propiciar maior exposição às doenças transmitidas por agulhas (O'HAGAN e RAPPUOLI, 2004).

A administração por via oral possui várias vantagens em relação às demais, como apresentar um acesso mais fácil, não oferecer riscos de transmissão de infecções através de agulhas contaminadas, riscos de efeitos hemolíticos ou possibilidade de dor durante sua utilização. Além disso, as crianças, que são a população alvo da maioria das vacinas, apresentam uma maior aceitabilidade à via oral. Apesar de tais vantagens, formulações vacinais orais capazes de induzir uma proteção eficiente, como acontece com a vacina contra poliomielite, são exceções (HOLMGREN e CZERKINSKY, 2005). Dentre as dificuldades em se produzir uma vacina oral, os autores destacam a facilidade com que o antígeno normalmente é degradado no trato gastrointestinal (TGI) e a sua baixa absorção pelo intestino.

O principal alvo das vacinas orais são as placas de Peyer, localizadas principalmente no íleo. As células M do epitélio intestinal (Figura 1), que recobrem as placas de Peyer, são as responsáveis por realizar o transporte dos patógenos para o tecido linfóide adjacente (LYDYARD e GROSSI, 1998). Antes de chegar ao seu sítio ativo, o antígeno precisa resistir ao pH ácido do estômago. Além disso, as placas de Peyer nem sempre internalizam os antígenos de forma eficiente ou eles podem não ser suficientemente potentes para estimular uma resposta imune (DE ALZPURUA e RUSSELHONES, 1998). Um dos principais parâmetros para que ocorra a internalização é o tamanho das partículas. Este pode ser determinante na interação antígeno-célula M, impedindo ou estimulando a resposta imune (RIEUX *et al.*, 2005).

Os adjuvantes possuem um importante papel no desenvolvimento das vacinas. Esses compostos são administrados juntamente com antígenos proteicos purificados com a finalidade de aumentar as respostas imunes. Eles são capazes de estimular as reações imunes inatas ao antígeno no sítio de exposição, sendo amplamente utilizados na produção de vacinas e na imunologia experimental (ABBAS *et al.*, 2011). Baseado nos seus principais mecanismos de ação, os adjuvantes podem ser divididos em dois grupos: (1) sistemas de entrega de vacinas, como emulsões, sais minerais e lipossomos (ALLISON, 1999 e SCHWANINGER *et al.*, 2004 *apud* LI *et al.*, 2013); (2) adjuvantes imunoestimulatórios, como os agonistas de receptores *toll-like* (TLR), saponinas e citocinas (PLOHMANN, 1997; ADAMS, 2009; GNJATIC *et al.*, 2010 *apud* LI *et al.*, 2013).

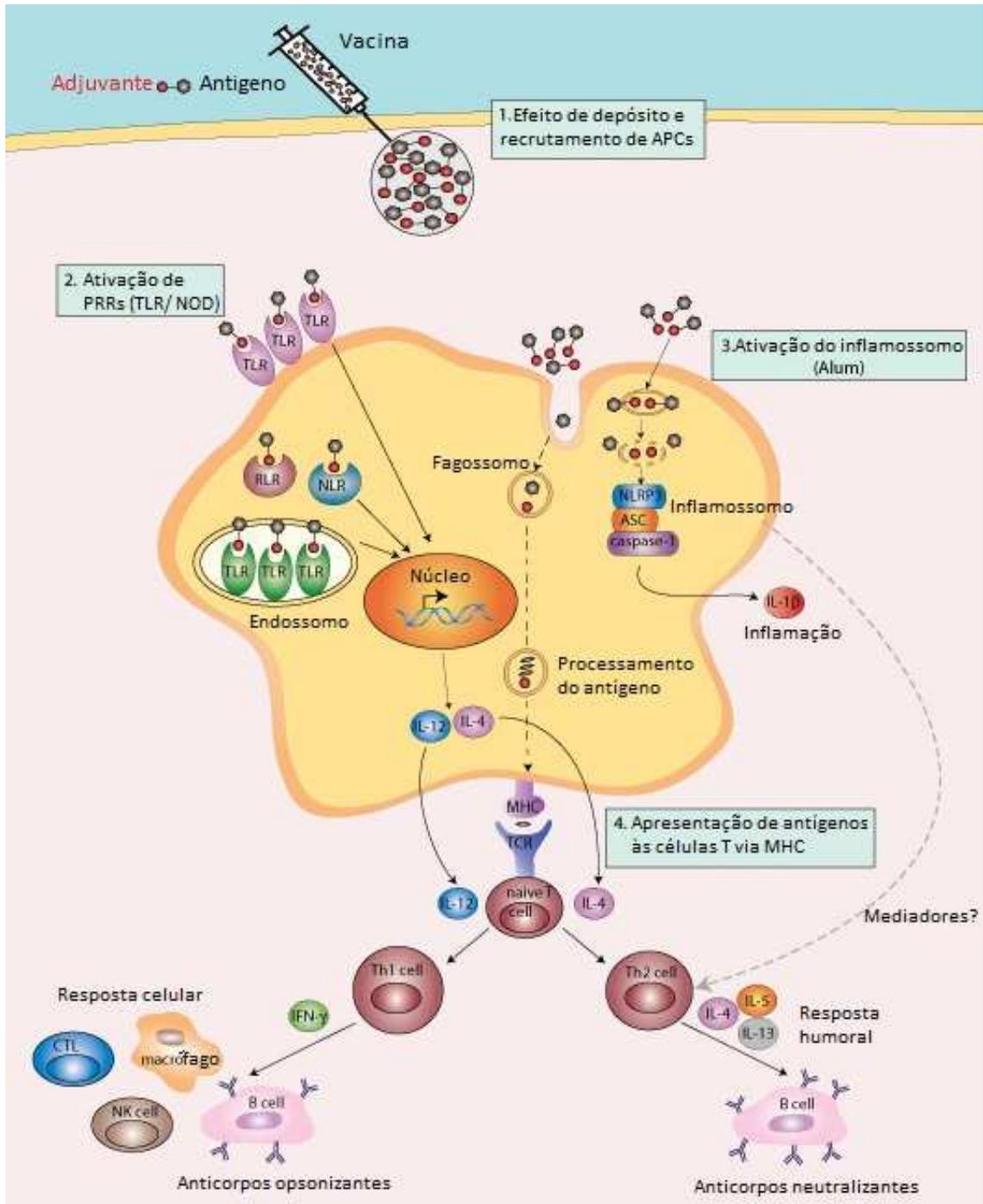


**Figura 1 – Funções do epitélio folicular associado.** O epitélio folicular associado (FAE) possui células com microdobras (M) que são especializadas na endocitose e no rápido transporte transepitelial de antígenos e microrganismos para bolsos intraepiteliais, que contém células B e T e ocasionalmente, células dendríticas (DCs). A maioria das células do FAE são enterócitos com microvilosidades apicais. Tais células não transportam antígenos, mas podem contribuir para a apresentação destes pela detecção de patógenos e seus produtos no lúmen e da liberação de sinais de citocinas e quimiocinas para atrair e ativar células dendríticas. CCL: CC-ligante de quimiocina; CCR: CC-receptor de quimiocina; TLR: receptor tipo Toll (Toll like).

\*Adaptado de Neutra e Koslowski, 2006 *apud* Oliveira, 2011.

Como ilustrado na Figura 2, alguns adjuvantes são capazes de direcionar a apresentação de antígenos através dos complexos principais de histocompatibilidade (MHC). Outros se ligam aos receptores de reconhecimento padrão (PRR), induzindo a imunidade inata e influenciando a resposta imune adaptativa, devido ao recrutamento de células apresentadoras de antígenos (APCs). Os membros de quase todas as famílias de PRRs são alvos potenciais para os adjuvantes, como os receptores Toll-like (TLRs), NOD-like (NLRs), RIG-I-like (RLRs) e receptores de lectina do tipo C (CLRs). Eles sinalizam através de vias que ativam diferentes fatores de transcrição. Estes por sua vez, induzem a produção de citocinas e quimiocinas, essenciais para a iniciação, expansão e polarização das respostas imunes. A ativação de alguns dos membros da família NLR, tais como NLRP3 e NLRC4, desencadeia a formação de um complexo proteico, o inflamossomo, que induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas IL-1 $\beta$

e IL-18). Os inflamassomos NLRP3 e NLRC4 também estão envolvidos na imunidade inata induzida por certos adjuvantes, mas seu mecanismo de ação ainda não foi elucidado.



**Figura 2 – Mecanismos de ação dos adjuvantes.**

\*Adaptado de InvivoGen, 2011.

## 1.2. Biocarreadores vacinais

Associação de vacinas aos sistemas carreadores nano ou microparticulados tem se mostrado uma estratégia promissora para aumentar a internalização dos estímulos pelas células M e evitar a degradação no TGI (MISHRA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Além disso, esses sistemas carreadores são capazes de atuar como adjuvantes ou imunoestimulantes, ativando a resposta imune através do aumento da imunogenicidade dos antígenos (JABBAL-GILL *et al.*, 1999).

O principal papel de um adjuvante é aumentar a imunogenicidade dos antígenos. O'Hagan e Rappuoli (2004) sugeriram que eles também realizem outras ações específicas, como as mostradas na Tabela 1. Eles destacaram a relevância que os adjuvantes têm demonstrado no desenvolvimento das vacinas, bem como o seu potencial para utilização futura.

**Tabela 1** – O papel dos adjuvantes no desenvolvimento das vacinas.\*

- 
1. Aumentar a resposta total ou funcional.
  2. Reduzir a dose de antígeno.
  3. Reduzir o número total de doses.
  4. Superar a competição na combinação de vacinas.
  5. Aumentar a resposta em jovens e idosos.
  6. Aumentar a velocidade e a duração da resposta.
  7. Induzir uma potente imunidade mediada por células.
  8. Induzir a imunidade mucosa.
  9. Possibilitar o desenvolvimento de vacinas bem sucedidas.
- 

\*Adaptado de O'Hagan e Rappuoli, 2004.

Garg *et al.* (2010 *apud* OLIVEIRA *et al.*, 2012) afirmam que os carreadores biodegradáveis e os poliméricos mucoadesivos são, aparentemente, os candidatos mais promissores na produção de vacinas destinadas à administração através das mucosas. Resultados significativos foram obtidos com a administração de vacinas via mucosa, utilizando diferentes polímeros de origem sintética e natural, como quitosana, o alginato e a gelatina.

A quitosana, polissacarídeo derivado da quitina, tem se mostrado um valioso carreador para vacinas orais, pois apresenta características extremamente favoráveis, como atoxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade (HIRANO, 1999; KURITA, 2006; JAYAKUMAR *et al.*, 2007; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; RINAUDO, 2008;

FRIEDMAN *et al.*, 2013), baixo custo e habilidade de abrir junções intercelulares (ILLUM, 1998). Além disso, a sua capacidade de formar nanopartículas facilmente (KISHEN *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2008; SHRESTHA *et al.*, 2009), aumenta a possibilidade do biopolímero ser absorvido no intestino, visto a importância do tamanho da partícula na absorção do antígeno pelas células M do epitélio intestinal. Segundo Rieux *et al.* (2005), o tamanho considerado ótimo para que as nanopartículas atravessem as células M é de no máximo 200nm.

## **2. OBJETIVO GERAL**

A presente revisão tem por objetivo organizar o acervo de dados disponíveis sobre a utilização da quitosana como biocarreador vacinal. Ao reunir informações apresentadas por diferentes autores, que mostram os potenciais de uso desse biopolímero em distintas áreas, objetiva-se a realização de estudo acerca de suas características, bem como da possibilidade de sua utilização sob diferentes formas, com destaque para as nanopartículas.

### 3. HISTÓRICO

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1881 por Braconnot, mas a escassez de conhecimentos básicos sobre suas propriedades limitou o avanço de suas aplicações industriais até a década de 1970 (ROBERTS, 1992 *apud* CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Richards (1951), ao escrever um livro referência sobre a quitina, incluiu a percepção da necessidade de mais informações químicas sobre o polissacarídeo e sua distribuição nos seres vivos. Até então, os testes colorimétricos existentes não eram capazes de identificar a real distribuição e localização da quitina nos organismos vivos (KUMAR *et al.*, 2004).

Apenas a partir de 1963 as técnicas específicas para identificação da quitina se tornaram mais acessíveis com a ascensão dos métodos de difração do raio-X de Rudall e o método enzimático de Jeuniaux. A década de 1970 foi marcada por importantes acontecimentos para a divulgação do conhecimento químico da quitina. Foram publicados os livros de Neville (1975), de Hepburn (1976) e de Muzzarelli (1977). Nesse mesmo ano, ocorreu a 1ª Conferência Internacional de Quitina e Quitosana. Após a realização de tais eventos, o interesse pela quitina deixou de ser restrito aos zoologistas, entomologistas marinhos e fisiologistas, passando a interessar também aos químicos. (KUMAR *et al.*, 2004). O grande interesse dos químicos pela quitina está relacionado ao fato desta ser uma abundante fonte de quitosana, o único polissacarídeo catiônico de origem natural. Tais características lhe conferem uma grande vantagem sobre os derivados catiônicos produzidos pelo homem a partir da celulose e do amido. Esta superioridade deve-se principalmente à biodegradabilidade da quitina e de seu derivado quitosana, o que chamou a atenção dos pesquisadores da época, que ainda celebravam polímeros artificiais biodegradáveis, como o nylon (KUMAR *et al.*, 2004).

A partir de então, o progressivo interesse na química da quitina levou ao surgimento de diversos estudos que buscavam a expansão do conhecimento sobre as relações entre as propriedades e as estruturas deste polissacarídeo e de seus derivados (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Os últimos 25 anos do século XX foram marcados por inúmeros avanços e descobertas sobre a quitina e a quitosana. Os principais foram relacionados por Kumar *et al.* (2004), como apresentado a seguir. Eles nos dão uma ideia geral da evolução do conhecimento sobre a quitina, ao longo desse período:

- I. Avanços tecnológicos (coloração, captação de espécies solúveis, ingredientes cosméticos funcionais);

- II. Significado bioquímico (ação na coagulação sanguínea, cicatrização de feridas, regeneração óssea, atividade imunoadjuvante);
- III. Inibição da biossíntese (inseticidas);
- IV. Enzimologia da quitina (isolamento e caracterização de quitinases, e sua biologia);
- V. Associação da quitosana com polímeros naturais e sintéticos (complexação polieletrólítica, uso em revestimentos e enxertos);
- VI. Uso da quitosana como suplemento alimentar e conservante de alimentos (produtos anticolesterolêmicos, revestimentos antimicrobianos para grãos e frutas exóticas).

Atualmente, existem melhores conhecimentos sobre os dois polímeros no que diz respeito principalmente a sua biodegradação, seus efeitos sobre vários tecidos, sua distribuição nos diferentes órgãos do corpo, sua capacidade de sofrer mucoadesão e a capacidade de associação da quitosana com alguns compostos inorgânicos. Dentre tais conhecimentos, os referentes aos sistemas de distribuição de drogas tem sido, sem dúvida, o grande alvo da atenção de estudiosos. Esse interesse se deve à biocompatibilidade da quitosana e ao fato dela não gerar reações adversas aos humanos (KUMAR *et al.*, 2004).

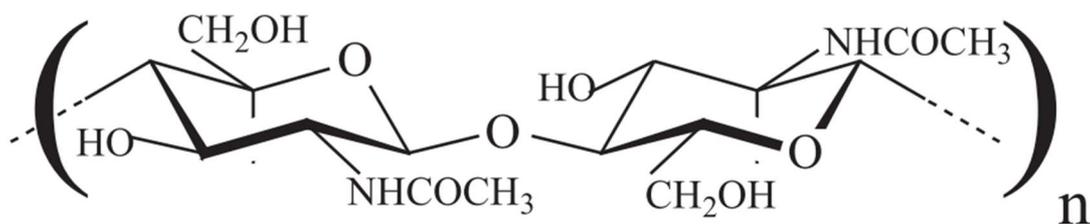
Apesar do enorme potencial da quitina e quitosana, e do conhecimento já acumulado sobre esses versáteis polímeros, Campana-Filho *et al.* (2007) avaliam que algumas de suas aplicações mais importantes ainda não foram implementadas na extensão esperada. A sua utilização na área farmacêutica, como vetores de medicamentos e vacinas, em dispositivos para liberação controlada de fármacos, e na medicina, como biomateriais, ainda não é tão expressiva quanto a sua utilização nas indústrias alimentícia e cosmética. Por não constar na lista de ingredientes inativos do Food and Drug Administration (FDA), o uso da quitosana como excipiente em medicamentos ainda não possui a aprovação desse órgão regulador (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Contudo, na última década, a pesquisa envolvendo a utilização deste biopolímero nas áreas farmacêutica e médica teve uma grande expansão. Trabalhos mais recentes mostram experimentalmente a eficácia da quitosana, como biomaterial (HIRANO e MIDORIKAWA, 1998; JAYAKUMAR *et al.*, 2010), biocarreador (JAYAKUMAR *et al.*, 2005) e também como adjuvante (WEN *et al.*, 2011).

## 4. CARACTERÍSTICAS DA QUITINA E QUITOSANA

### 4.1. Quitina

A quitina é o segundo polímero mais abundante que se conhece, ficando atrás apenas da celulose, apesar de apresentar uma taxa de reposição que chega a ser quase o dobro desta. Considerada o polissacarídeo de maior importância, é sintetizada por um grande número de organismos vivos. A quitina pode ser extraída da biomassa ou a partir de matérias-primas abundantes e relativamente baratas, como o exoesqueleto de artrópodes, algas diatomáceas e paredes celulares de fungos. Ela também compõe a estrutura esquelética de anelídeos, moluscos e celenterados. Vide Tabela 02 (KUMAR *et al.*, 2004; RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Suas principais fontes de obtenção são as carapaças de caranguejos e de camarões, comumente descartadas por indústrias pesqueiras (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

Este importante polímero é encontrado na natureza como microfibrilas cristalinas ordenadas (RINAUDO, 2006). A bioquímica, regulação e genética dessa molécula são bem conhecidas (KUMAR *et al.*, 2004). A quitina possui estrutura linear e é formada por uma unidade repetitiva de dissacarídeo composto por 2-acetamino-2-desoxi-D-glicopiranosose e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose unidos por ligação glicosídica (Figura 3) (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007; ANITHA *et al.*, 2009). Normalmente, na quitina predominam as unidades repetitivas formadas exclusivamente por 2-acetamino-2-glicose-D-glicopiranosose, possuindo apenas em torno de 5 a 10% de unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose.



**Figura 3 – Estrutura primária de quitina, onde n é o grau de polimerização.**

Fonte: CAMPANA-FILHO *et al.* (2007).

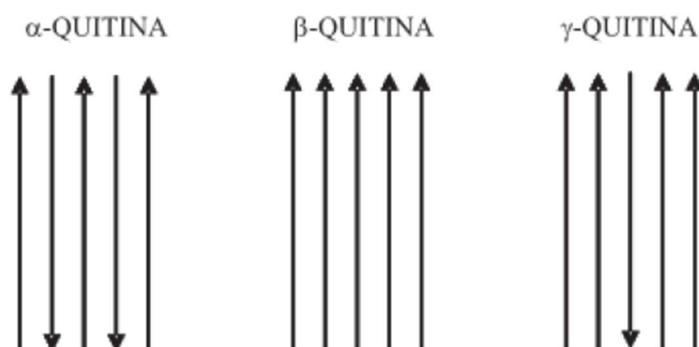
**Tabela 2** – Quantidade média de quitina em alguns organismos.\*

Crustáceos	Quitina (% em massa)
<i>Cancer</i> (caranguejo)	72,1(c)
<i>Carcinus</i> (caranguejo)	0,4 – 3,3(a)
<i>Callinectes</i> (caranguejo azul)	14,0(a)
<i>Chionecetes</i> (caranguejo Matsuba)	25,9(d)
<i>Erimacrus</i> (caranguejo)	18,4(d)
<i>Paralithodes</i> (caranguejo rei)	10,6(d)
<i>Pleuroncodes</i> (caranguejo vermelho)	35,0(b), 10,4(a), 1,3 – 1,8(b)
Camarão do Alasca	28,0(d)
<i>Crangon</i> (camarão)	5,8(d), 11,6(d), 69,1(c)
<i>Macrobrachiumrosenbergii</i> (camarão de água doce)	25,3 +/- 0,2(e), 24,4 +/- 1,0(f)
<i>Metapenaeus</i>	32,4(d)
<i>Nephrops</i> (lagosta)	69,8(c)
<i>Homarus</i> (lagosta)	60,8 – 77,0(c)
<i>Peneus</i>	25,0(d)
<i>Lepas</i>	58,3(c)
“Krill” (zooplâncton de mares frios)	40,2 – 40,0(d)
Insetos	Quitina (% em massa)
<i>Blattella</i> (barata)	10(b), 18,4(c), 35(c)
<i>Bombyx</i> (bicho da seda)	44,2(c)
<i>Coleoptera</i> (besouro)	5,0 – 15,0(b)
<i>Diptera</i> (mosca verdadeira)	54,8(c)
<i>Galleria</i> (minhoca)	33,7(c)
Gafanhoto	2,0 – 4,0(a)
Besouro de Maio	16,0(b)
<i>Periplaneta</i> (barata)	2,0(c)
<i>Pieris</i> (borboleta)	64(c)
Aranha	38,2(d)
Moluscos	
Conchas de molusco	6,1
Conchas de ostras	3,6
Gládios de lulas	40,0
Fungos	
<i>Aspergillusniger</i>	42,0(g)
<i>Lactariusvellereus</i> (cogumelo)	19,0
<i>Mucorrouxii</i>	44,5
<i>Penicilliumchysogenum</i>	20,1(g)
<i>Penicilliumnotatum</i>	18,5(g)
<i>Saccharomycescerevisiae</i>	2,9(g)

a) massa úmida do corpo; b) massa seca do corpo; c) fração orgânica da cutícula; d) massa total seca da cutícula; e) massa seca do abdômen; f) massa seca das cascas; g) massa seca da parede celular. \*Adaptado de CAMPANA-FILHO *et al.* (2007) p.646.

De acordo com sua fonte e com o papel que desempenha, a quitina pode se apresentar sob diferentes estruturas polimórficas denominadas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina. A diferenciação entre essas estruturas é feita de acordo com seu arranjo no estado sólido e

a disposição de cadeias do polímero nas lamelas ou folhas constituintes dos domínios cristalinos (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). A figura 4 representa de forma esquemática a diferença entre as famílias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -quitina.

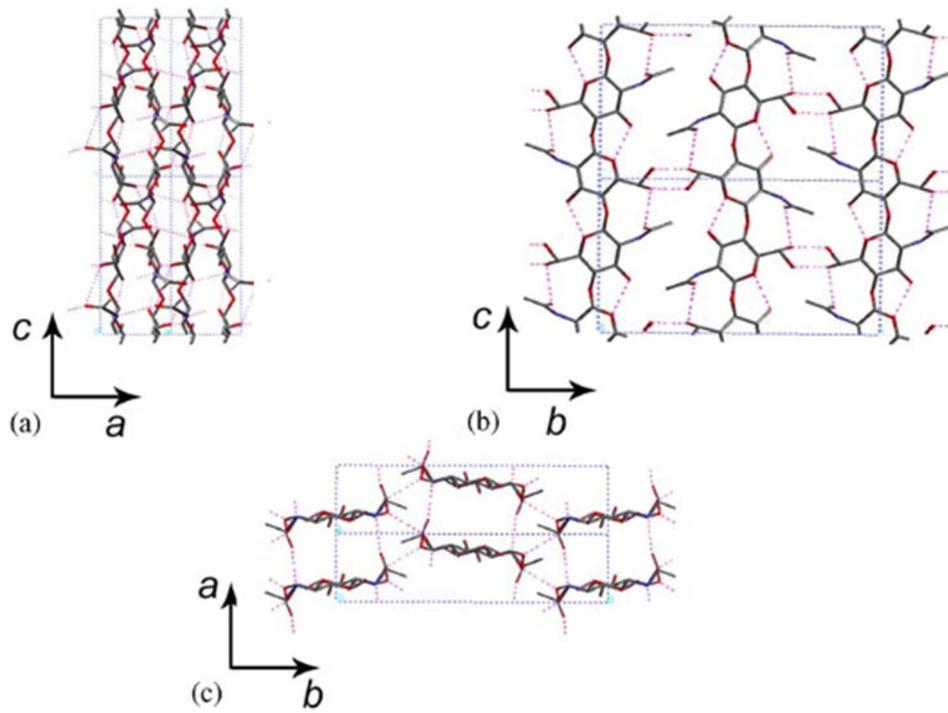


**Figura 4 – Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina.** As setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não redutor para o redutor.

Fonte: CAMPANA-FILHO *et al.* (2007).

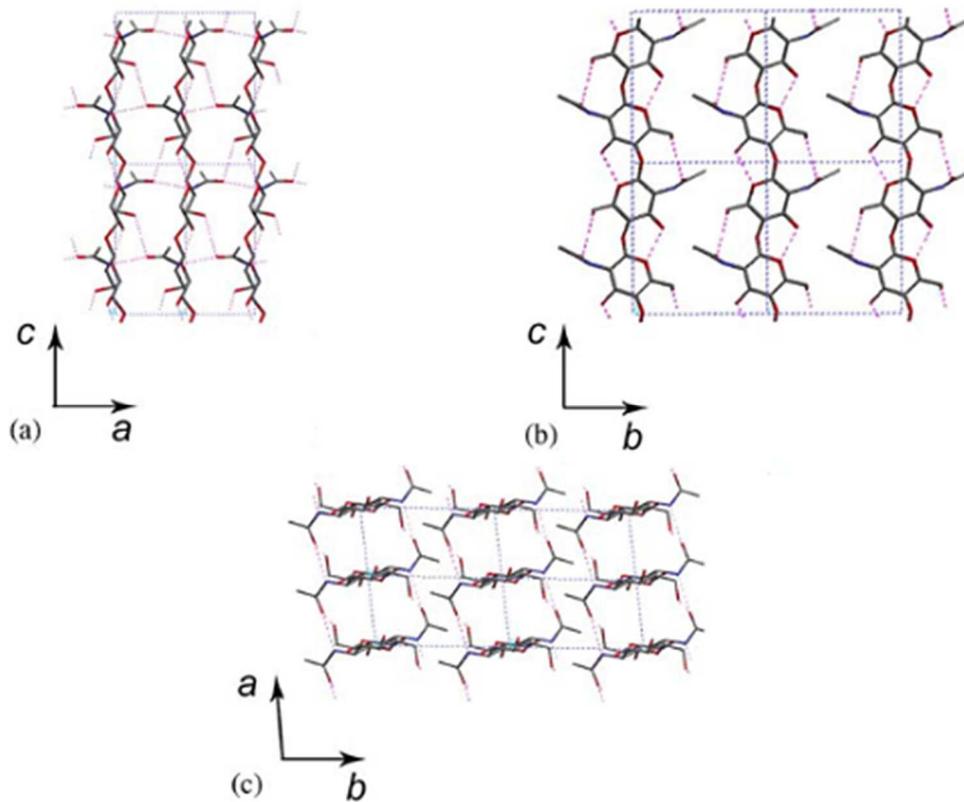
A  $\alpha$ -quitina (Figura 5) é a forma mais abundante, sendo encontrada associada fortemente a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos, em estruturas rígidas e resistentes, como a parede celular de fungos, em krills, lagostas, carangueijos, conchas e na cutícula de insetos (RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Esta família, considerada também como a mais estável, apresenta suas cadeias poliméricas em lamelas ou folhas distintas dispostas de forma antiparalela, o que permite que haja um denso empacotamento. Essa estrutura favorece a ocorrência de muitas ligações de hidrogênio inter e intra-cadeias na mesma lamela e em lamelas distintas. Apesar de ser insolúvel em água, esta forma é capaz de absorver e reter umidade (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A  $\beta$ -quitina (Figura 6), mais rara, é encontrada em associação com proteínas compondo estruturas flexíveis, embora também resistentes, como os gládios ou plumas de lulas, sendo também produzida por vermes, algas e protozoários (RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Esta estrutura possui um empacotamento menos denso que a  $\alpha$ -quitina, visto que apresenta cadeias de diferentes lamelas dispostas paralelamente, dificultando a ocorrência de ligações de hidrogênio intermoleculares. Possui um aspecto fibroso e, assim como a  $\alpha$ -quitina, também não é solúvel em água, mas devido a sua menor densidade, é capaz de absorver mais umidade (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).



**Figura 5 – Estrutura da alfa-quitina.**

Fonte: RINAUDO (2006), p.606.



**Figura 6 - Estrutura anidra da beta-quitina.**

Fonte: RINAUDO (2006), p.606.

A forma  $\gamma$ -quitina, também encontrada em estruturas flexíveis e resistentes, como a espessa cutícula de revestimento de determinadas zonas do estômago de lulas, é considerada uma combinação do arranjo estrutural das duas formas anteriores. Tais estruturas apresentam cadeias de duas lamelas em disposição paralela intercaladas com lamelas de cadeias antiparalelas (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Segundo Atkins (1985, *apud* RINAUDO, 2006), a forma  $\gamma$ -quitina é uma variação da família da  $\alpha$ -quitina.

Dentre as principais características da quitina, destacam-se a insolubilidade em água e maioria dos solventes orgânicos usuais e sua baixa toxicidade (ANITHA *et al.*, 2009). Devido à dificuldade de solubilização em solventes comuns, a quitina é frequentemente convertida em seu derivado mais desacetilado, a quitosana (KURITA, 2001; RINAUDO, 2006; JAYAKUMAR *et al.*, 2010). Este importante derivado da quitina apresenta um grau de desacetilação entre 50 a 60% (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A solubilidade da quitina é restrita a uns poucos sistemas solventes (normalmente soluções concentradas de ácidos fortes) e sua dissolução é muito lenta, tanto de  $\alpha$ - como de  $\beta$ -quitina, provocando contínua despolimerização (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). Já a sua atoxicidade, somada às demais características como a biodegradabilidade, propriedades antibacterianas, hidrofobicidade, capacidade de formar gel e afinidade por proteínas, permitem que ela seja empregada na indústria alimentícia, como clarificante, e na farmacêutica por ser um acelerador da cicatrização (RINAUDO, 2006).

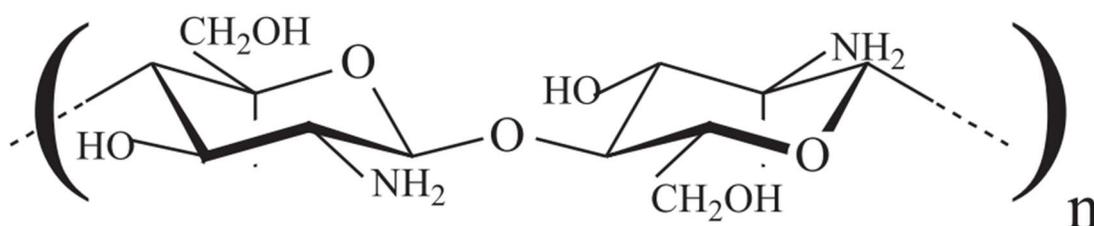
Por se tratar de um produto natural raramente encontrado em forma pura, cuja biossíntese não é estritamente controlada por fatores genéticos, a quitina possui grande variação em sua composição quanto ao comprimento das cadeias, conteúdo de unidades glicosamina acetiladas e desacetiladas e sua distribuição ao longo das cadeias. Dessa forma, realizar a purificação da quitina, extraindo completamente as substâncias com as quais ela se associa na natureza, não é uma tarefa simples. O padrão de pureza necessário para algumas aplicações é difícil de ser alcançado. A medicina, as indústrias farmacêutica e alimentícia são áreas em que alto padrão de pureza é exigido, sendo realizada, por exemplo, a determinação do conteúdo residual de metais pesados no material (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A desacetilação da quitina pode ser realizada por processos químicos ou microbiológicos, utilizando enzimas ou microrganismos. Para originar a quitosana, devem ocorrer hidrólises alcalinas em sítios reativos dos domínios cristalinos da quitina,

porém, o acesso a esses sítios é limitado, o que impede que a reação seja homogênea e completa ao longo de todas as cadeias dos grupos acetamida. Como consequência, em indústrias e laboratórios, copolímeros de composição e massa molar variáveis são originados a partir da desacetilação da quitina, sem que haja uma padronização das propriedades e características em condições de reprodutibilidade (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

## 4.2. Quitosana

A quitina raramente é desacetilada por completo, visto que são necessárias muitas reações consecutivas para que isto ocorra, o que favoreceria a sua progressiva despolimerização. Quando o polímero de quitina chega a um grau de desacetilação de no mínimo 50%, ele começa a se solubilizar em meio ácido aquoso, e passa a ser chamado de quitosana. Dessa forma, a quitosana é um polissacarídeo linear, obtido a partir da desacetilação da quitina (Figura 7) (RINAUDO, 2006).



**Figura 7. Estrutura primária da quitosana, onde n é o grau de polimerização.**

\*Adaptado de CAMPANA-FILHO *et al.* (2007).

A quitosana é o mais importante derivado da quitina sendo o único polímero catiônico pseudonatural. Esta característica exclusiva permite que ela tenha várias aplicações, como por exemplo, a capacidade de atuar como floculante para recuperação de proteínas e a despoluição. Além disso, a sua solubilidade em soluções aquosas, possibilita que seja largamente utilizada em diferentes aplicações, como géis, filmes e fibras (RINAUDO, 2006).

A qualidade da quitosana depende diretamente das condições empregadas nos tratamentos sequenciais e também da natureza da matéria prima empregada para a sua extração da quitina. Tal dependência é confirmada por relatos de problemas de reprodutibilidade das características de quitina e quitosana comerciais (SIGNINI e CAMPANA-FILHO, 1999, *apud* CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

### 4.2.1. Características Químicas

A estrutura primária da quitosana é semelhante à da quitina, com a diferença de que na quitosana predominam as unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose. Como

apenas a quitosana é solúvel em soluções ácidas diluídas, como o ácido acético e ácido clorídrico, na prática, é esta característica que permite uma distinção mais rápida entre ela e a quitina (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

De acordo com o grau de desacetilação da quitina, as características da quitosana podem sofrer variações, além da possibilidade de ocorrência de simultâneas reações de despolimerização e outras reações colaterais (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

A despolimerização da quitosana ocorre com facilidade. A reação com o ácido nitroso, por exemplo, pode ser facilmente controlada, sendo rápida e seletiva, o que proporciona uma estabilização dos produtos e da estequiometria. Além disso, ela também pode ser facilmente despolimerizada por diversas hidrolases, como lisozima, lipase, pectinase, celulase, hemicelulase dentre outras (KUMAR *et al.*, 2004).

#### 4.2.1.1. Solubilidade

Normalmente, a solubilidade da quitosana é testada em ácido acético a uma concentração de 1% ou 0,1M do ácido. A capacidade de solubilização da quitosana em meio ácido ocorre com a protonação da função  $-NH_2$  na posição C-2 da unidade de repetição D-glicosamina (RINAUDO, 2006).

Rinaudo (2006) afirma que a concentração de prótons necessária para que ocorra a solubilização da quitosana precisa ser, no mínimo, igual à quantidade de unidades de  $-NH_2$  envolvidas. Além disso, vários autores afirmam que a solubilidade desse polissacarídeo depende tanto do seu grau de desacetilação quanto da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e também de seu peso molecular (RINAUDO e DOMARD, 1989; AIBA, 1991; KUBOTA e EGUCHI, 1997 *apud* RINAUDO, 2006).

A desacetilação, que normalmente ocorre no estado sólido, causa uma irregularidade na estrutura molecular devido à característica semicristalina do polímero. A taxa de protonação da quitosana foi analisada em soluções diluídas dos ácidos clorídrico e acético, mostrando que a taxa de ionização depende do pH do ácido e do pK da substância. Desta forma, de acordo com os dados de pK e pK<sub>0</sub> obtidos em soluções de ácido clorídrico e ácido acético, concluiu-se que a quitosana é solúvel em pH abaixo de 6,0 (RINAUDO *et al.*, 1999a; RINAUDO *et al.*, 1999b *apud* RINAUDO, 2006) e insolúvel em água, em pH alcalino ou em solventes orgânicos. Entretanto, a sua neutralização com ácidos, como o ácido clorídrico, acético, láctico ou fórmico, forma sais de quitosana que são solúveis em água (RABEA *et al.*, 2003).

Outros estudos mostraram uma forma de quitosana obtida em presença de glicerol-2-fosfato (CHENITE *et al.*, 2000; CHENITE *et al.*, 2001; MOLINARO, *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2005 *apud* RINAUDO, 2006) que é solúvel em água, em pH neutro. Foram obtidas soluções estáveis a um pH de 7,0 – 7,1, à temperatura ambiente. Em temperaturas acima de 40°C, observou-se a formação de um gel.

Resumindo, não é fácil controlar a solubilidade da quitosana, visto que esta propriedade sofre influência da desacetilação, da concentração iônica, do pH, da natureza do ácido utilizado para a protonação e da distribuição de grupos acetil ao longo da cadeia. Além disso, as ligações de hidrogênio intra-cadeias bem como as condições de obtenção da quitosana são outros fatores que afetam a solubilidade da mesma (AIBA, 1991 *apud* RINAUDO, 2006).

#### 4.2.1.2. Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade variável das soluções de quitosana. Os fatores que influem nessa variação são o grau de desacetilação, peso molecular, concentração, pH e temperatura. Em sistemas fechados, o aumento da temperatura normalmente provoca uma redução da viscosidade da solução. O efeito do pH sobre a viscosidade varia de acordo com o ácido utilizado para a sua obtenção (RABEA *et al.*, 2003).

#### 4.2.1.3. Peso molecular

O peso molecular é outra importante característica desses polímeros, visto que interfere tanto na viscosidade como na solubilidade. Esta última propriedade é o maior motivo de preocupação, devido à possível dificuldade de solubilização das amostras e dissociação dos agregados frequentemente presentes nas soluções (RINAUDO, 2006). De acordo com Muramatsu *et al.*, (2003 *apud* KUMAR *et al.*, 2004), o peso molecular da quitosana pode ser reduzido por radiação gama e uma reticulação térmica pode compensar essa diminuição.

Outro fato que aumenta a importância do peso molecular é a possibilidade dessa característica exercer alguma influência na capacidade carreadora de genes. Junginger *et al.* (1998, 2000 e 2002 *apud* KUMAR *et al.*, 2004) sintetizaram um derivado da quitosana de baixo peso molecular, o trimetil cloreto de quitosana. Eles observaram que este derivado é mais adequado como carreador de DNA que a quitosana isolada.

No trabalho em que estudaram a formação de nanopartículas de poli (butil cianoacrilato) carregadas positivamente estabilizadas por quitosana, Yang *et al.* (2000, *apud* KUMAR *et al.*, 2004) demonstraram que, juntamente com fatores como pH, concentração e volume da solução de quitosana, o peso molecular desse polímero também influencia no tamanho das partículas.

RABEA *et al.* (2003) afirmam que a maioria das atividades fisiológicas e propriedades funcionais da quitosana e seus derivados dependem do peso molecular da mesma. Além disso, tem sido discutida a possibilidade dessa propriedade ter alguma influência na capacidade da quitosana em alterar o metabolismo e funções fisiológicas de microrganismos.

#### **4.2.2. Propriedades e Aplicações**

A quitosana apresenta os grupos funcionais amino e hidroxila, os quais podem sofrer modificações, para conferir as propriedades desejadas de acordo com a função biológica a ser desempenhada (PILLAI *et al.*, 2009). Dessa forma, apresenta grandes vantagens em relação à celulose, como por exemplo a presença de quatro grupos funcionais em sua fórmula, a sua característica catiônica e consequente capacidade de formar complexos polieletrólíticos e derivados de nitrogênio, de acordo com o grupo amino primário (KUMAR *et al.*, 2004).

A natureza química da quitosana permite que ocorram alterações covalentes e iônicas que possibilitam adequações das propriedades biológicas e mecânicas de acordo com sua aplicação (KIM *et al.*, 2008). Os grupos amino da quitosana podem originar produtos com propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiácidas, antialérgicas, e anti-ulcerogênicas biocompatíveis e biodegradáveis (PILLAI *et al.*, 2009).

A versatilidade da quitosana é evidente, de modo que ela também é utilizada nas indústrias cosmética e alimentícia e como agente de floculação no tratamento de efluentes aquosos. Além disso, esse polissacarídeo é capaz de interagir com diversas substâncias, o que permite a sua aplicação na detecção, análise e recuperação das mesmas. Dentre tais substâncias, se destacam as proteínas, lipídeos, pesticidas, corantes, íons metálicos e radioisótopos. A quitosana, por apresentar significativa atividade antimicrobiana e devido a sua atoxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade é aplicada não apenas na

indústria farmacêutica, mas também na agricultura, medicina e odontologia (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007).

#### 4.2.2.1. Ação antimicrobiana e antifúngica

A natureza catiônica da quitosana possibilita que ela interaja com diversas moléculas negativamente carregadas, o que a permite ser considerada um bioadesivo. Devido a sua excelente atividade antimicrobiana e antifúngica, seu amplo espectro de ação e baixa toxicidade em células de mamíferos, a quitosana possui grandes vantagens sobre outros tipos de desinfetantes. A sua carga positiva possibilita uma interação com membranas celulares microbianas carregadas negativamente, de modo que atua principalmente na superfície externa das bactérias. Esta interação provoca uma alteração na permeabilidade da célula bacteriana, o que leva a um extravasamento de diversos constituintes intracelulares (RABEA *et al.*, 2003).

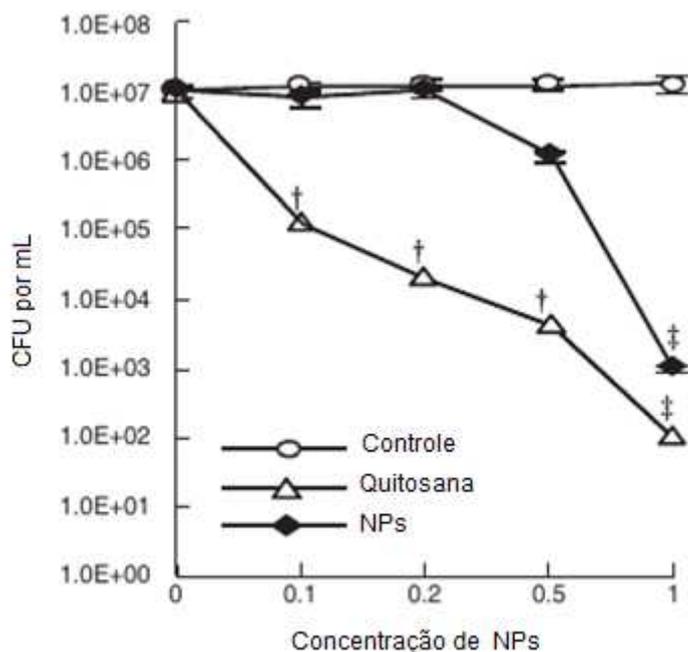
A atuação como agente quelante é outro mecanismo de ação antibacteriano da quitosana. Ela se liga seletivamente a qualquer traço de metal e induz uma inibição da produção de toxinas e do crescimento microbiano. Em uma terceira possibilidade de mecanismo de ação, a quitosana de baixa massa molar penetra na célula e liga-se ao DNA, inibindo a síntese de RNA e proteínas. Contudo, a baixa solubilidade da quitosana em pH acima de 6,5 faz com que sua atividade antimicrobiana seja observada apenas em meio ácido (RABEA *et al.*, 2003).

Jia *et al.* (2001) demonstraram a atividade antibacteriana da quitosana, na forma de sais de amônio quaternário solúveis em água. A produção do sal ocorre por meio da reação do grupo amino da quitosana com um aldeído, formando o intermediário imina ou Base de Schiff, que por sua vez reage com iodeto de metila e origina o sal quaternário da quitosana (SILVA *et al.*, 2006).

A quitosana tem sido aplicada em diversos trabalhos, cujos pesquisadores buscam acentuar a ação antimicrobiana desse polímero por meio de associações com adjuvantes. Ong *et al.*, (2008) avaliaram um complexo formado pela quitosana com o adjuvante hemostático polifosfato em relação a seu potencial antimicrobiano e cicatrizante. Estes autores demonstraram que a associação do complexo à prata, produz um efeito bactericida significativo em relação ao complexo isolado quitosana-polifosfato.

Vários foram os autores que mostraram a atuação antimicrobiana da quitosana. Friedman *et al.* (2013) incubaram diferentes concentrações de nanopartículas de

quitosana associadas a alginato com *Propionibacterium acnes* e avaliaram sua atividade antimicrobiana medindo a quantidade de unidades formadoras de colônia (CFU) obtidas por mL. Os resultados mostraram que as nanopartículas do conjugado tiveram um significativo efeito na inibição da formação de colônias, mas a quitosana isolada induziu a uma inibição ainda maior (Figura 8). O alginato não demonstrou efeito sobre o crescimento bacteriano, evidenciando que a eficácia da inibição da formação de colônias pelo conjugado se deve apenas à presença da quitosana.



**Figura 8. Efeitos antimicrobianos de nanopartículas (NPs) de quitosana-alginato.** A avaliação de unidades formadoras de colônias (CFU) foi realizada na presença de diferentes concentrações (1; 0,5; 0,2 e 0,1) de NPs quitosana-alginato.

\*Adaptado de Friedman *et al.* (2013). p. 1233.

#### 4.2.2.2. Biocompatibilidade e Biodegradabilidade

A excelente biocompatibilidade da quitosana é uma de suas principais características juntamente com sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (HIRANO, 1999; KURITA, 2006; JAYAKUMAR *et al.*, 2007; RINAUDO, 2008). Essas propriedades permitem que o polímero seja amplamente utilizado na engenharia de tecidos, incluindo os tecidos ósseo (ZHAO *et al.*, 2010 *apud* DASH *et al.*, 2011),

cartilaginosa (HAO *et al.*, 2010), hepática (SEO *et al.*, 2006 *apud* DASH *et al.*, 2011) e sistema nervoso (HAIPENG *et al.*, 2000 *apud* DASH *et al.*, 2011).

A biodegradabilidade da quitosana é extremamente lenta ao ser comparada com a de seus derivados. Tais derivados são mais propensos à degradação que as moléculas de quitosana, e isso se deve parcialmente ao fato destes serem cristalinos (KUMAR *et al.*, 2004). Em geral, o grau de desacetilação influencia na taxa e extensão da biodegradabilidade da quitosana. Quanto mais desacetilada for a molécula, menor será a taxa de degradação da mesma (XU *et al.*, 1996; YANG *et al.*, 2007).

A biodegradabilidade de derivados da quitosana foi investigada nos trabalhos de SASHIWA *et al.*, (2000 e 2003a *apud* KUMAR *et al.*, 2004). Os derivados do polissacarídeo foram inicialmente preparados por meio de reação em água, ácido acético e outros reagentes derivados do ácido acrílico (SASHIWA *et al.*, 2003b *apud* KUMAR *et al.*, 2004). A partir dos resultados, os autores sugeriram que a biodegradabilidade está fortemente associada à estrutura química das moléculas. Os grupos de polietilenoglicol (PEG), carboxil, amônio quaternário e amido propiciaram uma maior biodegradabilidade enquanto os grupamentos hidroxietil e nitrilo não tiveram um resultado tão satisfatório. Além disso, também foi verificado, que essa propriedade independe da solubilidade em água dos compostos químicos, visto que houveram derivados solúveis e insolúveis com uma boa taxa de biodegradabilidade.

#### 4.2.2.3. Ação antiinflamatória

A quitosana possui várias propriedades anti-inflamatórias (KIM *et al.*, 2004) e essas características tem sido cada vez mais estudadas. De acordo com Ueno *et al.* (2001, *apud* FRIEDMAN *et al.*, 2013) a quitosana possui um papel imunológico que inclui a inibição de citocinas pró-inflamatórias e a promoção da granulação do tecido através do recrutamento de fibroblastos. A união desses dados sugere que, além de possuir um efeito antimicrobiano, a quitosana também atua como antiinflamatório.

Friedman *et al.* (2013) investigaram se citocinas e quimiocinas inflamatórias induzidas por *P. acnes* poderiam ser moduladas na presença de nanopartículas de quitosana associadas ao alginato. Monócitos isolados de sangue periférico, estimulados com *P. acnes*, foram colocados em presença de diferentes concentrações de nanopartículas de quitosana com alginato. Os resultados mostraram que houve uma crescente redução da indução de citocina IL-12 por *P. acnes* com o aumento da

concentração das nanopartículas, demonstrando um significativo efeito anti-inflamatório do conjugado.

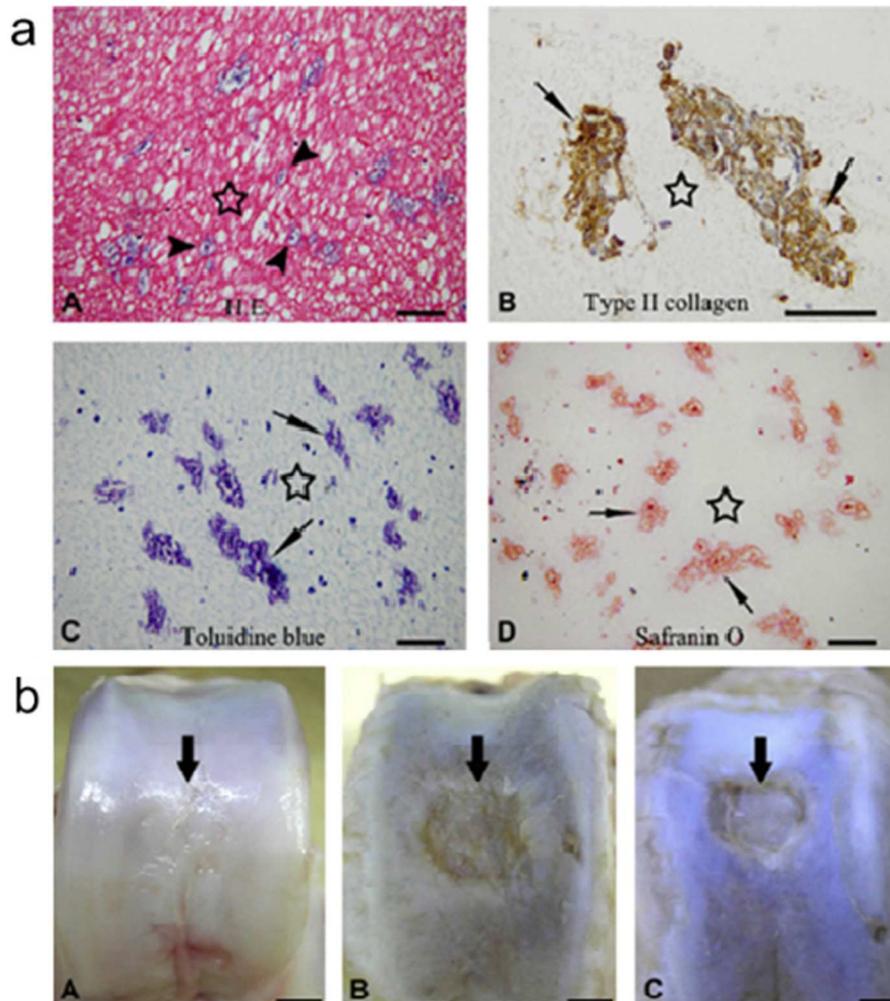
#### 4.2.2.4. Utilização como biomaterial e ação cicatrizante

Além de suas aplicações nas indústrias cosmética e alimentícia e na área farmacêutica, como vetores de medicamentos e vacinas e em dispositivos para liberação controlada de fármacos, a quitosana pode ser aplicada em medicina (CAMPANA-FILHO *et al.*, 2007). As ações antimicrobiana e hemostática bem como a biocompatibilidade da quitosana, fazem desse polissacarídeo um excelente biomaterial, com atuação que se estende à cicatrização de feridas (MI *et al.*, 2001 *apud* ONG *et al.*, 2008).

A utilização da quitosana na engenharia de tecidos voltada para a regeneração óssea tem sido cada vez mais pesquisada. Essa recente expansão teve início após a demonstração da capacidade do biopolímero em induzir o crescimento celular e aumentar a deposição de matriz óssea por osteoblastos em cultura celular (SEOL *et al.*, 2004 *apud* DASH *et al.*, 2011).

Na regeneração de tecidos cartilagosos, o polissacarídeo também tem apresentado grande sucesso, inclusive em regiões da articulação. Um excelente exemplo desse sucesso é um estudo *in vivo* (HAO *et al.*, 2010 *apud* DASH *et al.*, 2011), em que a cartilagem articular defeituosa foi reparada completamente em 24 semanas (Figura 9).

Ueno *et al.* (1999, *apud* FRIEDMAN *et al.*, 2013) demonstraram que a quitosana também induz a produção de colágeno tipo III. Esta característica desempenha importante papel na aceleração do processo de cicatrização, ao mesmo tempo em que contribui para o seu sucesso na engenharia de tecidos.



**Figura 9 – Uso da quitosana no reparo experimental de cartilagem articular: (a)** Acúmulo de matriz na engenharia de tecidos cartilaginosos. Histologia e imunohistoquímica de condrócitos cultivados em hidrogel de quitosana por 3 semanas. Os resultados mostraram que os condrócitos em hidrogel de quitosana acumularam matriz contendo glicosaminoglicana (GAG) sulfatada pericelular. A- Coloração de HE; B- Coloração imunohistoquímica de colágeno tipo II; C- Coloração azul de toluidina; D- Coloração safranina-O. Estrela: hidrogel de quitosana; Cabeças das setas: núcleos celulares; Setas: matriz dos condrócitos. Barra = 100 $\mu$ m.

**(b)** Observação macroscópica da cartilagem articular recuperada após 24 semanas da operação. A- Parte do defeito da cartilagem no grupo experimental foi coberta suavemente com tecido hialino branco reluzente. A cartilagem normal circundante é quase indistinguível. Sinais não claros da margem com a cartilagem normal podem ser vistos na superfície das áreas regeneradas; B- Os defeitos no grupo controle 1 foram parcialmente reparados com tecido semelhante à fibra, deixando uma pequena depressão nas áreas defeituosas; C- No grupo controle 2 são detectados em uma fina e irregular superfície do tecido, defeitos e rachaduras ao redor da cartilagem normal. Seta: defeito; Barra = 0,5cm. Fonte: HAO *et al.*, 2010 *apud* DASH *et al.*, 2010.

### 4.2.3. Formas de preparo

A possibilidade de ser preparada sob diferentes formulações, como soluções de viscosidade controlada, géis, filmes, membranas, microesferas e nanopartículas, faz com que a quitosana tenha uma variedade de aplicações ainda mais ampla (KISHEN *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2008; SHRESTHA *et al.*, 2009).

A utilização na área biomédica dessas diferentes formas só é possível graças à sua propriedade de biocompatibilidade (RINAUDO, 2006).

#### 4.2.3.1. Fibras e Filmes

A eletrofição foi descrita por Pillai *et al* (2009) como um método promissor e versátil de processamento de fibras com diâmetros de escala nanométrica.

A habilidade em formar filmes é outra característica que a quitosana apresenta, diferentemente da celulose (KUMAR *et al.*, 2004). Wang *et al.* (2005) testaram a associação de filme de quitosana com nanotubos de carbono. O trabalho demonstrou que o composto foi capaz de aumentar significativamente o módulo de tensão após a incorporação de apenas 0,8% de nanotubos de carbono multivalentes.

#### 4.2.3.2. Hidrogéis

Diferentes trabalhos mostram a obtenção de hidrogéis de quitosana por meio do tratamento com ânions polivalentes, como o glicerolfosfato (CHENITE *et al.*, 2000 *apud* RINAUDO, 2006), o ácido oxálico (YAMAGUCHI *et al.*, 1978; HIRANO *et al.*, 1990a; ZHANG *et al.*, 1994; *apud* RINAUDO, 2006) e o tripolifosfato (DESAI e PARK, 2005 e LEE *et al.*, 1998 *apud* RINAUDO, 2006).

#### 4.2.3.3. Microesferas

Existem diferentes formas de se obter microesferas de quitosana, sendo um deles a secagem por pulverização. Esse método inclui quatro estágios: atomização através de um bico de pulverização, contato com ar quente, secagem das gotículas e separação da quitosana sólida. Pode-se aplicar essa técnica em diferentes formas de quitosana, como sais, suspensões, gelatina com óxido de etileno e também em mistura do polímero com

etilcelulose (KUMAR *et al.*, 2004). Trabalhos relatam a obtenção de microesferas com diâmetro entre 2 e 5µm, que apresentam uma melhor funcionalidade na capacidade de ligação. Além disso, a capacidade de ser comprimida torna a microesfera de quitosana um interessante carreador de drogas (HE *et al.*, 1999; DAVIS, 1999; REGE *et al.*, 2003; DE LA TORRE *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2002; SHI e TAN, 2002 *apud* KUMAR *et al.*, 2004).

Segundo Muzzarelli *et al.* (2004), a utilização do sal de carbamato de amônio é outra possibilidade para a secagem por pulverização destinada a obtenção de transportadores de fármacos. Kumar *et al.* (2004) descreveram a preparação do sal de carbamato de amônio de quitosana a partir de cloridrato de quitosana, obtendo microesferas, em sua maioria, insolúveis.

Outra possibilidade de formação de microesferas descritas por Kumar e colaboradores se dá por meio da formação de complexos de polieletrólitos de quitosana com poliânions, como a 6-oxiquitina, heparina, carragenina, pectina, ácido hialurônico, xantina, carboximetil celulose e DNA, dentre outros. Essas preparações resultam em uma imediata e desordenada precipitação das substâncias insolúveis, principalmente em pH neutro ou básico.

O preparo de microesferas também pode ser feito utilizando-se a técnica de emulsão múltipla. Este método, demonstrado por Genta *et al.* (1997 *apud* KUMAR *et al.*, 2004) inclui três etapas:

1. Preparação de uma emulsão primária em que a fase dispersa em óleo é composta de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e a fase aquosa contínua.
2. Formação de emulsão múltipla com óleo mineral;
3. Evaporação do solvente aquoso sob pressão reduzida.

#### 4.2.3.4. Nanopartículas

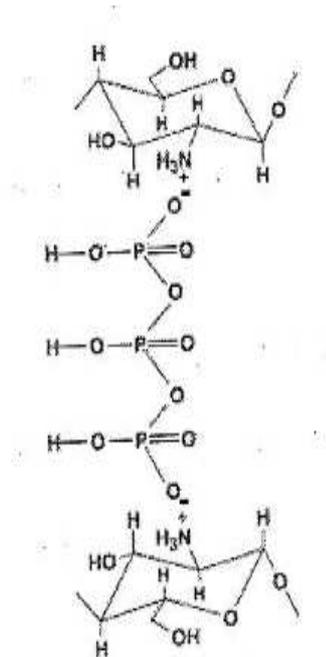
A quitosana tem sido amplamente utilizada em forma de micropartículas e nanopartículas, especialmente na pesquisa de novos fármacos. Na formulação dessas formas, tem-se evitado a utilização de solventes orgânicos ou alta tensão de cisalhamento via ionotrópica e automontagem de polieletrólitos, preservando a imunogenicidade dos antígenos (PREGO *et al.*, 2010 e LIU *et al.*, 2013 *apud* SAHDEV *et al.*, 2014).

As nanopartículas são compostas por, no máximo, algumas centenas de átomos e o seu tamanho varia de 1 a 100nm. A produção de materiais na escala nanométrica apresenta diversas vantagens para diferentes áreas, com destaque para a área farmacêutica. Um determinado material produzido nessa escala, pode ter o aprimoramento de suas propriedades, como uma maior resistência, leveza ou funcionalidade. Para os biomateriais, a característica destacada mais evidente é a sua biocompatibilidade (WILSON *et al.*, 2010).

Comparadas às micropartículas, as nanopartículas são mais vantajosas por serem mais adequadas para administração intravenosa. As possibilidades de associação com nanopartículas são diversas, de modo que fármacos e outras moléculas utilizadas juntamente com tais formas podem apresentar-se dissolvidas em seu interior, encapsuladas, adsorvidas, aprisionadas ou anexadas às mesmas (WILSON *et al.*, 2010).

A capacidade da quitosana de gelatinizar quando em contato com poliânions específicos, permite que as nanopartículas sejam originadas por meio da gelificação iônica que ocorre entre seus sítios positivos e os negativos do tri-polifosfato de sódio (TPP) (KISHEN *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2008; SHRESTHA *et al.*, 2009). Essa característica possibilitou que o método de gelificação iônica passasse a ser descrito como um dos métodos mais utilizados para a produção de nanopartículas (QI *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005; DU *et al.*, 2008; DU *et al.*, 2009; DUDHANI e KOSARAJU *et al.*, 2010). No caso da quitosana, essa técnica consiste na união da sua fase ácida com a fase alcalina de TPP, ocorrendo a formação de nanopartículas imediatamente após a mistura destas fases. Neste processo, formam-se ligações inter e intramoleculares entre os fosfatos do TPP e os grupos amino da quitosana (Figura 10).

O processo de gelificação iônica apresenta como uma de suas vantagens a possibilidade de variação de tamanho e potencial zeta das NPs formadas, mediante o controle direto de parâmetros críticos do processamento. Gan *et al.* (2005) e Ali *et al.* (2010) descreveram como principais parâmetros: o pH das soluções de quitosana e de TPP, relação peso quitosana/ TPP, concentração de quitosana, temperatura da solução de quitosana e velocidade de agitação da solução de quitosana. A importância desses fatores se deve à possibilidade de protonação ou desprotonação dos grupamentos amino da quitosana, de acordo com a variação de pH. Os autores concluíram que as modificações de tamanho, forma e potencial zeta das nanopartículas influenciam a atividade antimicrobiana.



**Figura 10 - Interação da quitosana com tri-polifosfato de sódio.**

Fonte: Laus (2006).

Devido ao seu alto potencial antimicrobiano, as nanopartículas se destacam entre os pós que apresentam essa atividade biológica. Além disso, a densidade de suas cargas e a sua maior área de superfície, permitem que elas tenham uma maior interação com as cargas negativas das bactérias (SHI *et al.*, 2006).

Friedman *et al.* (2013) demonstraram a ação antimicrobiana de nanopartículas de quitosana associadas ao alginato. A associação foi utilizada *in vitro* contra *Propionibacterium acnes*, tendo como resultado um efeito bactericida. Foi demonstrado por imagem de microscopia eletrônica que as nanopartículas de quitosana associadas ao alginato induzem o rompimento da membrana celular da bactéria, provocando a lise celular.

Estudos mostraram que a atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana é diretamente proporcional ao seu potencial zeta. Du *et al.* (2009) produziram nanopartículas de quitosana com a utilização do método de gelificação iônica e associação a íons metálicos. Quando isoladas, as nanopartículas mostraram um potencial zeta de aproximadamente +51,37 mV, enquanto que, quando carregadas com os íons  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , apresentaram um potencial zeta de +88,69 e +86,65 mV, respectivamente. Os testes de Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida foram aplicados e

as nanopartículas de maior potencial zeta apresentaram uma maior atividade antimicrobiana (DU *et al.*, 2009).

As nanopartículas de quitosana são também utilizadas na área biomédica como carreadoras de fármacos, num sistema de liberação lento e contínuo da droga. Ela apresenta vantagens diante de outras substâncias preparadas como nanopartículas. Destacamos a sua capacidade de controlar a liberação de agentes ativos e a sua solubilidade em soluções aquosas ácidas, evitando o uso de solventes perigosos ou tóxicos durante sua preparação (WILSON *et al.*, 2010).

Na área médica, as nanopartículas de quitosana também têm mostrado resultados bastante promissores. Shi *et al.* (2006) avaliaram a atividade antimicrobiana de cimento ósseo contendo nanopartículas de quitosana. Eles mostraram que, diferentemente de quando é feita a incorporação de íons de prata no cimento, as nanopartículas de quitosana não causam efeitos citotóxicos, quando em altas concentrações, como ocorre com os primeiros. Além da não citotoxicidade, os autores concluíram que a adição das nanopartículas aumentou o potencial antimicrobiano e também a resistência do cimento ósseo. Dessa forma, a utilização de nanopartículas de quitosana como biomaterial pode ser bastante útil para se reduzir a ocorrência de contaminações e infecções por microrganismos em pacientes implantados (SHI *et al.*, 2006).

A atividade antimicrobiana das nanopartículas de quitosana também foi avaliada na área odontológica, com a incorporação destas a um cimento endodôntico à base de zinco e eugenol. Os autores mostraram que ocorreu um reforço da atividade dos cimentos em dois tipos de testes: com contato direto e com a presença de uma membrana limitando o contato, embora neste segundo a atividade tenha sido mais branda (KISHEN *et al.*, 2008). Em outro trabalho, foi aplicado um sistema de liberação de nanopartículas de quitosana no interior de túbulos dentinários por meio de uma técnica de ultrassom focado de alta intensidade (HIFU). O objetivo era de auxiliar na desinfecção dos canais radiculares, e para isso as nanopartículas eram menores que o diâmetro dos túbulos dentinários, variando entre 80 e 120nm. Apesar da distribuição não ter sido uniforme, foi verificada uma penetração de 1.000 µm dentro dos túbulos dentinários (SHRESTHA *et al.*, 2009).

## 5. PERSPECTIVAS

Como exposto no presente trabalho, a biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxicidade proporcionam à quitina e à quitosana um enorme potencial de desenvolvimento, direcionado principalmente para as áreas biomédica e farmacêutica. Ambos os polissacarídeos têm sido amplamente aplicados na química, biotecnologia, agricultura, veterinária, odontologia, processamento de alimentos, proteção ambiental e medicina (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003; KATO *et al.*, 2003 *apud* LI *et al.*, 2012).

Diferentemente da quitina, a estrutura química da quitosana permite que ela tenha capacidade de realizar uma extensa variedade de interações (SYNOWIECKI e AL-KHATEEB, 2003; KATO *et al.*, 2003 *apud* LI *et al.*, 2012). Essa capacidade se deve, parcialmente, à facilidade em formar nanopartículas, tendo em vista que esta forma aumenta a capacidade de ligação a outras moléculas, especialmente às proteínas (KUMAR *et al.*, 2004). A presença de diferentes grupos funcionais na molécula permite que o polissacarídeo seja processado em diferentes formulações farmacêuticas, como filmes, soluções, comprimidos, membranas, micropartículas e nanopartículas. Juntamente com suas demais características, essa variedade de formulações favorece que a quitosana tenha um amplo espectro de atuação em distintas áreas.

As possibilidades de utilização desse composto aumentaram após Muzzarelli *et al.* (2003, *apud* SILVA *et al.*, 2006) desenvolverem um sistema que torna a quitosana solúvel, mesmo em pH 10. A solubilidade é adquirida após a formação do íon carbamato de amônio, com a adição de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , como demonstrado na Equação 1:



A quitosana na forma de íon carbamato de amônio tem apresentado excelentes resultados como biocarreador após a produção de microesferas do polímero com a utilização do método de pulverização a seco (MUZZARELLI *et al.*, 2003 *apud* SILVA *et al.*, 2006).

As peculiaridades desse polissacarídeo, muitas vezes são explicadas por sua facilidade de interação, que se deve principalmente ao grupamento amino livre. Tais características ampliam as possibilidades de suas aplicações farmacológicas. A quitosana pode ser utilizada como agente antimicrobiano, regenerador de tecidos, cicatrizante,

hipocolesterolemiantes, coagulantes, além do uso destacado como adjuvante e biocarreador, dentre outros. A sua abundante disponibilidade na natureza é outra vantagem do composto. Por ser obtido, principalmente, do exoesqueleto de crustáceos, apresenta viabilidade econômica e ecológica.

Por todos esses motivos, é de grande importância que haja um maior investimento em pesquisas que busquem esclarecer e aprofundar o conhecimento acerca das aplicações e mecanismos de ação desse versátil e promissor polissacarídeo.

## 6. CONCLUSÕES

Considerando a importância da vacinação como intervenção de saúde, devido a sua eficácia e custo-benefício, o desenvolvimento de novas vacinas para as diversas doenças que acometem o ser humano é imprescindível a nossa sociedade. Os desafios no desenvolvimento de uma vacina são muitos e incluem principalmente a sua estabilidade, baixo custo, necessidade de poucas doses, administração segura e estratégia de liberação. Dessa forma, a busca por adjuvantes e sistemas carreadores mais eficientes e biocompatíveis tem sido cada vez mais intensa.

A quitosana tem se mostrado um excelente candidato a adjuvante “ideal”, devido às vantajosas propriedades que apresenta. São diversos os trabalhos que mostram a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade e sua propriedade antimicrobiana, características essenciais para o seu sucesso nas áreas biomédica e farmacêutica. Além disso, a sua estrutura química possibilita a capacidade de realizar interações com diferentes grupos funcionais, permitindo uma variada gama de aplicações de acordo com a adequação às propriedades químicas e biológicas. A presença dos grupos funcionais amino e hidroxila na molécula do biopolímero permite a ocorrência de modificações necessárias para desempenhar a função biológica desejada.

Outro diferencial desse versátil composto é a facilidade em formar nanopartículas, o que aumenta a capacidade de absorção pelo organismo em diferentes tecidos. Porém, um destaque especial deve ser dado à capacidade de ser absorvido pelo epitélio intestinal, o que favorece a sua utilização como biocarreador de vacinas administradas por via oral.

A quitosana ainda possui o efeito de adjuvante, visto que sua presença junto ao imunógeno está associada a um aumento da resposta imune. Acredita-se que este importante derivado da quitina tenha atuação na resposta imune, recrutando macrófagos e outras células para o local da infecção e estimulando a imunidade humoral. Porém, é necessário que sejam feitos mais estudos a fim de se esclarecer os mecanismos de ação, ainda não totalmente elucidados.

Dessa forma, este valioso polissacarídeo, principalmente na forma de nanopartículas, tem um papel extremamente significativo no desenvolvimento de novas vacinas e tende a ser cada vez mais estudado e utilizado como biocarreador e adjuvante.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. e PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2011.
- ADAMS, S. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy*, v. 1, n. 6, p. 949-964, 2009.
- AIBA, S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 13, p. 40-44, 1991.
- ALI, S. W.; JOSHI, M. e RAJENDRAN, S. Modulation of size, shape and surface charge of chitosan nanoparticles with references to antimicrobial activity. *Advanced Science Letters*, v. 3, p. 452-460, 2010.
- ALLISON, A. C. Squalene and squalene emulsions as adjuvants. *Methods*, v. 19, n. 1, p. 87-93, 1999.
- ANITHA, A.; RANI, V.; KRISHNA, R.; SREEJA, V.; SELVAMURUGAN, N.; NAIR, S.; TAMURA, H. e JAYAKUMAR, R. Synthesis, characterization, cytotoxicity and antibacterial studies of chitosan, O-carboxymethyl and N, O-carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, n. 4, p. 672-677, 2009.
- ATKINS, E. D. T. Conformation in polysaccharides and complex carbohydrates. *Journal of Biosciences*, v. 8, n.1-2, p. 375-387, 1985.
- AZAD, N. e ROJANASAKUL, Y. Vaccine delivery: current trends and future. *Current Drug Delivery*, v. 10, p. 137-146, 2006.
- BORGES, O. M. F. O uso de nanopartículas de quitosano revestidas com alginato como adjuvante do antígeno da hepatite B na vacinação através das mucosas oral e nasal. Tese de doutorado. Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, Portugal, 2007.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; DE BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R. e LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina. *Química Nova*, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M. D. e HOEMANN, C. D. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, v. 21, p. 2155-2161, 2000.
- CHENITE, A.; BUSCHMANN, M. D.; WANG, D.; CHAPUT, C. e KANDANI, N. Rheological characterization of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, v. 46, p. 39-47, 2001.
- CHO, J.; HEUZEY, M. C.; BEGUIN, A. e CARREAU, P. J. Physical gelation of chitosan in the presence of  $\beta$ -glycerophosphate: the effect of temperature. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 3267-3275, 2005.

- DASH, M.; CHIellini, F.; OTTENBRITE, R.M. e CHIellini, E. Chitosan: a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.
- DAVIS, S. S. e ILLUM, L. Sustained release chitosan, microspheres prepared by novel spray drying methods. *Journal of Microencapsulation*, v. 16, n. 3, p. 343-355, 1999.
- DE ALZPURUA, H. J. e RUSSELJONES, G. J. Oral vaccination: identification of classes of proteins that provoke an immune response upon oral feeding. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 167, n. 2, p. 440-451, 1998.
- DE LA TORRE, P. M.; ENOBakhARE, Y.; TORRADO, G. e TORRADO, S. Release of amoxicillin from polyionic complexes of chitosan and poly(acrylic acid) study of polymer/polymer and polymer/drug interactions within the network structure. *Biomaterials*, v. 24, n. 8, p. 1499-1506, 2003.
- DESAI, K. G. H. e PARK, H. J. Encapsulation of vitamine C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, v. 22, p. 179-192, 2005.
- DES RIEUX, A.; RAGNARSSON, E. G. E.; GULLBERG, E.; PREAT, V.; SCHNEIDER, Y. J. e ARTURSSON, P. Transport of nanoparticles across an in vitro model of the human intestinal follicle associated epithelium. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 25, n.4-5, p. 455-465, 2005.
- DU, W. L.; XU, Z. R. e HAN, X. Y. Preparation, characterization and adsorption properties of chitosan nanoparticles for eosin Y as a model anionic dye. *Journal of Hazardous Materials*, v. 153, n. 2, p. 152-156, 2008.
- DU, W. L.; NIU, S. S. e XU, Y. L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions. *Carbohydrate Polymers*, v. 75, n. 3, p. 385-389, 2009.
- DUDHANI, A. R. e KOSARAJU, S. L. Bioadhesive chitosannanoparticles: preparation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, v. 81, p. 234-251, 2010.
- FRIEDMAN, A. J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D. O.; CHAMPER, J.; QIN, M.; BLECHER-PAZ, A. K.; OREN, A.; LIU, P. T.; MODLIN, R. L. e KIM, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan-alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, p. 1231-1239, 2013.
- GAN, Q.; WANG, T. e COCHRANE, C. Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 44, p. 65-73, 2005.
- GAO, H. J.; SHI, W. D. e FREUND, L. B. Mechanics of receptor-mediated endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, n. 27, p. 9469-9474, 2005.
- GARG, N. K.; MANGAL, S.; KHAMBETE, H.; SHARMA, P. K. e TYAGI, R. K. Mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymers. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*, v. 4, n. 2, p. 114-128, 2010.

GENTA, I.; GIUNCHEDI, P.; PAVANETTO, F.; CONTI, B.; PERUGINI, P. e CONTE, U. Chitin Handbook. In: Muzzarelli, R. A. A.; Peter, M. G. *Chitin Handbook*, Italia: Atec. 1997.

GNJATIC, S.; SAWHNEY, N. B. e BHARDWAJ, N. Toll-like receptor agonists are they good adjuvants? *Cancer Journal*, v. 16, n. 4, p. 382-391, 2010.

HAIPEG, G.; YINGHUI, Z.; JIANCHUN, L.; YANDAO, G.; NANMING, Z. e XIUFANG, Z. Studies on nerve cell affinity of chitosan-derived materials. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 52, p. 285-295, 2000.

HAO, T.; WEN, N.; CAO, J. K.; WANG, H. B.; LU, S. H.; LIU, T.; LIN, Q. X.; DUAN, C. M. e WANG, C. Y. The support of matrix accumulation and the promotion of sheep articular cartilage defects repair in vivo by chitosan hydrogels. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 18, p. 257-265, 2010.

HE, P.; DAVIS, S. S. e ILLUM, L. Chitosan microspheres prepared by spray drying. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 187, n. 1, p. 53-65, 1999.

HEPBURN, H.R. *The Insect Integumen*, Amsterdam: Elsevier, 1976.

HIRANO, S.; YAMAGUCHI, R.; FUKUI, N. e IWATA, M. A chitosan oxalate gel: its conversion to na N- acetylchitosan gel via a chitosan gel. *Carbohydrate Research*, v. 20, p. 145-149, 1990.

HIRANO, S. e MIDORIKAWA, T. Novel method for the preparation of N-acylchitosan fiber and N-acylchitosan-cellulose fiber. *Biomaterials*, v. 19, p. 293-297, 1998.

HIRANO, S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International*, v. 48, p. 732-734, 1999.

HOLMGREN, J. e CZERKINSKY, C. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine*, v. 11, p. 45-53, 2005.

HUANG, Y. C.; YEH, M. K. e CHIANG, C. H. Formulation factors in preparing BTM – chitosan microspheres by spray drying method. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 242, n. 1-2, p. 239-242, 2002.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. *Pharmaceutical Research*, v. 15, n. 9, p. 1326-1331, 1998.

INVIVOGEN, Inovation within Reach. *Mechanisms of adjuvants*. Vaccine adjuvants review, 2011. Disponível em: < <http://www.invivogen.com/>>. Acesso em: 15 fevereiro 2015. il. color.

JABBAL-GILL, I.; LIN, W.; JENKINS, P.; WATTS, P.; JIMENEZ, M.; ILLUM, L.; DAVIS, S. S.; WOOD, J. M.; MAJOR, D.; MINOR, X.; LI, E. C.; LAVELLE, A. G. A. e COOMBES, A. G. A. Potential of polymeric lamellar substrate particles (PLSP) as adjuvants for vaccines. *Vaccine*, v. 18, n. 3-4, p. 238-250, 1999.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARANA, M.; REIS, R. L. e MANO, J. F. Graft copolymerized chitosan-present status and applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 62, n. 142-158, 2005.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TUKURA, S. e TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 40, p. 175-81, 2007.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARANA, M.; NAIR, S.V. e TAMURA, H. Novel chitin and chitosan nanofibers in biomedical applications. *Biotechnology Advances*, v. 28, p. 142-150, 2010.

JUNGINGER, H. E.; SIEVAL, A. B.; THANOU, M.; KOTZÉ, A. F.; VERHOEF, J. C. e BRUSSEE, J. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 157-165, 1998.

JUNGINGER, H. E.; THANOU, M. M.; KOTZÉ, A. F.; SCHARRINGHAUSEN, T.; LUESSEN, H. L.; DE BOER, A. G. e VERHOEF, J. C. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. *Journal of Controlled Release*, v. 64, n. 1-3, p. 15-25, 2000.

JUNGINGER, H. E.; THANOU, M.; FLOREA, B. I.; GELDOF, M. e BORCHARD, G. Quaternized chitosan oligomers as novel gene delivery vectors in epithelial cell lines. *Biomaterials*, v. 23, n. 1, p. 153-159, 2002.

KEAN, T. e THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery*, v. 62, p. 3-11, 2010.

KIM, I. Y.; SEO, S. J. e MOON, H. S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*, v. 26, p. 1-21, 2008.

KISHEN, A.; SHI, Z. e SHRESTHA, A. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 12, p. 1515-1520, 2008.

KUBOTA, N. e EGUCHI, Y. Facile preparation of water-soluble N-acetylated chitosan and molecular weight dependence of its water-solubility. *Polymer Journal*, v. 29, n. 2, p. 123-127, 1997.

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H. e DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 12, p. 6017-6084, 2004.

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, v. 26, n. 9, p. 1921-1971, 2001.

- KURITA, K. Chitin and Chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.
- LARANJEIRA, M. C. M. e DE FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.
- LAUS, R.; LARANJEIRA, M. C. M. e MARTINS, A. O. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 34-39. 2006.
- LEE, S. T.; MI, F. L.; SHEN, Y. J.; SHYU, S. S. e TANG, I. H. *The copper (II) uptake by chitosan tri-polyphosphate chelating resin and related kinetic studies advances in chitin science*. Publis National Taiwan Ocean University, v. 3, 1998. p. 475-480.
- LI, X.; MIN, M.; DU, N.; GU, Y.; HODE, T.; NAYLOR, M.; CHEN, D.; NORDQUIST, R. E. e CHEN, W. R. Chitin, chitosan and glycated chitosan regulate immune responses: the novel adjuvants for cancer vaccine. *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2013, 2012.
- LIU, Z.; LV, D.; LIU, S.; XIONG, M.; CHEN, X.; XIONG, R.; TAN, X.; GONG, J. e WANG, D. Alginic acid-coated chitosan nanoparticles loaded with legumain DNA vaccine: effect against breast cancer in mice. *PLoS One*, v. 8, n. 4, p. 1-11, 2013.
- LYDYARD, P. e GROSSI, C. The lymphoid system. London: Mosby. *Immunology*, 1998.
- MISHRA, N.; GOYAL, A. K.; TIWARI, S. e PALIWAL, S. R. Recent advances in mucosal delivery of vaccines: role of mucoadhesive/biodegradable polymeric carriers. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, v. 20, n. 5, p. 661-679, 2010.
- MOLINARO, G.; LEROUX, J. C.; DAMAS, J. e ADAM, A. Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials*, v. 23, p. 2717-2722, 2002.
- MURAMATSU, K.; MASUDA, S.; YOSHIHARA, Y. e FUJISAWA, A. In vitro degradation behavior of freeze-dried carboxymethyl-chitin sponges processed by vacuum-heating and gamma irradiation. *Polymer Degradation and Stability*, v. 81, n. 2, p. 327-332, 2003.
- MUZZARELLI, R.A.A. *Chitin*; Oxford: Pergamon Press, 1977.
- MUZZARELLI, C.; TOSI, G.; FRANCESCANGELI, O. e MUZZARELLI, R. A. A. Alkaline chitosan solutions. *Carbohydrate Research*, v. 338, n. 21, p. 2247-2255, 2003.
- MUZZARELLI, C.; VESNA, S.; GOBBI, L.; TOSI, G. e MUZZARELLI, R. A. A. Spray-drying of solutions containing chitosan together with polyuronans and characterisation of the microspheres. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, n. 1, p. 73-82, 2004.
- NEUTRA, M. R. e KOZLOWSKI, P. A. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nature Reviews Immunology*, v. 6, n. 2, p. 148-158, 2006. il. color.

- NEVILLE, A.C. *Biology of the Arthropod Cuticle*, 1.ed. New York: Springer-Verlag, 1975.
- O'HAGAN, D.T. e RAPPUOLI, R. Novel approaches to vaccine delivery. *Pharmaceutical Research*, v. 21, n. 9, p. 1519-1530, 2004.
- OLIVEIRA, C. R.; RESENDE, C. M. F.; SILVA, M. R.; PÊGO, A. P.; BORGES, O. e GOES, A. M. A new strategy based on Smrho protein loaded chitosan nanoparticles as a candidate oral vaccine against Schistosomiasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 11, p. 1881-1894, 2012.
- OLIVEIRA, C. R. *Nanopartículas de quitosana como novo sistema de liberação vacinal contra a esquistossomose*. 2011. 99 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Imunologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- PILLAI, C. K. S.; PAUL, W. e SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.
- PLOHMANN, B.; BADER, G.; HILLER, K. e FRANZ, G. Immunomodulatory and antitumor effects of triterpenoid saponins. *Pharmazie*, v. 52, n. 12, p. 953-957, 1997.
- PLOTKIN, S. A. Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine*, v. 11, n. 4, Suppl S, p. 5-11, 2005.
- PREGO, C.; PAOLICELLI, P.; VICENTE, S.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J.; DÍAZ, B. e GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. Chitosan based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection. *Vaccine*, n. 28, v. 14. p. 2607-2614, 2010.
- QI, L.; XU, Z. e JIANG, X. Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, v. 339, n. 16, p. 2693-2700, 2004.
- QI, L.; XU, Z. e JIANG, X. Citotoxic activities of chitosan nanoparticles and copper-loaded nanoparticles. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 5, p. 1397-1399, 2005.
- RABEA, E.I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G. e STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.
- RAPPUOLI, R.; PIZZA, M.; DEL GIUDICE, G. e DE GREGÓRIO, E. Vaccines, new opportunities for a new society. *PNAS*, v. 111, n. 34, p. 12288-12293, 2014.
- REGE, P. R.; GARMISE, R. J. e BLOCK, L. H. Spray-dried chitinosans: part II: in vitro drug release from tablets made from spray-dried chitinosans. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 252, n. 1-2, p. 53-59, 2003.
- RINAUDO, M. e DOMARD, A. Solutions properties of chitosan. In: Skajak-Braek, G., Anthosen. T.; Sandford, P. *Chitin and chitosan*. Sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications, 1989. p. 71-86.

RINAUDO, M.; PAVLOV, G. e DESBRIÈRES, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. *International Journal of Polymer Analysis and Characterization*, v. 5, p. 267-276, 1999a.

RINAUDO, M. PAVLOV, G. e DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, v. 40, p. 7029-7032, 1999b.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, v. 57, n.3, p. 397-430, 2008.

ROBERTS, G. A. F. Structure of chitin and chitosan. *Chitin Chemistry*. London: Mc Milan Press Ltd, 1992. v. 1. p. 8-20.

SASHIWA, H.; SHIGEMASA, Y. e ROY, R. Novel N-alkylation of chitosan via Michael type reaction. *Chemistry Letters*, v. 29, n. 8, p. 862-863, 2000.

SASHIWA, H.; YAMAMORI, N.; ICHINOSE, Y.; SUNAMOTO, J. e AIBA, S-I. Chemical modification of chitosan, 17<sup>a</sup> Michael reaction of chitosan with acrylic acid in water. *Macromolecular Bioscience*, v. 3, n. 5, p. 231-233, 2003a.

SASHIWA, H.; YAMAMORI, N.; ICHINOSE, Y.; SUNAMOTO, J. e AIBA, S-I. Michael reaction of chitosan with various acryl reagents in water. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 5, p. 1250-1254, 2003b.

SCHWANINGER, R.; WAELTI, E.; ZAJAC, P.; WETTERWALD, A.; MUELLER, D. e GIMMI, C. D. Virosomes as new carrier system for cancer vaccines. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, v. 53, n. 11, p. 1005-1017, 2004.

SEO, S. J.; KIM, I. Y.; CHOI, Y. J.; AKAIKE, T.; CHO, C. S. Enhanced liver functions of hepatocytes cocultured with NIH 3T3 in the alginate/galactosylated chitosan scaffold. *Biomaterials*, v. 27, p. 1487-1495. 2006.

SEOL, Y. J.; LEE, J. Y.; PARK, Y. J.; LEE, Y. M.; YOUNG, K.; RHYU, I. C.; LEE, S. J.; HAN, S. B.; CHUMG, C. P. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 1037-1041. 2004.

SHRESTHA, A.; FONG, S.-W. e KHOO, B.-C. Delivery of antibacterial nanoparticles into dentinal tubules using high-intensity focused ultrasound. *Journal of Endodontics*, v. 35, n. 7, p. 1028-1033, 2009.

SHI, X-Y. e TAN, T-W. Preparation of chitosan/ethylcellulose complex microcapsule and its application in controlled release of Vitamin D<sub>2</sub>. *Biomaterials*, v. 23, n. 23, p. 4469-4473, 2002.

SHI, Z.; NEOH, K. G. e KANG, E. T. Antibacterial and mechanical properties of bone cement impregnated with chitosan nanoparticles. *Biomaterials*, v. 27, n. 11, p. 2440-2449, 2006.

SIGNINI, R. e CAMPANA-FILHO, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. *Polymer Bulletin*, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1999.

SILVA, H. S. R. C.; DOS SANTOS, K. S. C. R. e FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

WORD HEALTH ORGANIZATION. *Global Vaccine Action Plan 2011-2020*. Disponível em: <[www.who.int/immunization/global\\_vaccine\\_action\\_plan/GVAP\\_doc\\_2011\\_2020/en/index.html](http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/index.html)>. Acesso em: 2 dezembro 2014.

WILSON, B.; SAMANTA, M. K.; KUMAR, K. P.; SAMPATH, S. B.; SANTHI, K. e RAMASAMY, M. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 6, n. 1, p. e144-e152, 2010.

YAMAGUCHI, R.; HIRANO, S.; ARAI, Y. e ITO, T. Chitosan salt gels thermally reversible elation of chitosan. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 42, n. 10, p. 1981-1982, 1978.

YANG, S. C.; GE, H. X.; HU, Y.; JIANG, X. Q. e YANG, C. Z. Formation of positively charged poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles stabilized with chitosan. *Colloid and Polymer Science*, v. 278, n. 4, p. 285-292, 2000.

YANG, Y. M.; HU, W.; WANG, X. D. e GU, X. S. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 18, n. 11, p. 2117-2121, 2007.

XU, J.; GROSS, R. A.; MCCARTHY, S. P. e KAPLAN, D. L. Chitosan film acylation and affects on biodegradability. *Macromolecules*, v. 29, n. 10, p. 3436-3440, 1996.

ZHANG, M.; KOHR, E. e HIRANO, S. Hydrogels of chitin and chitosan. In: NISHINARI, K.; DOI, E. *Food hydrocolloids: structures, properties and function*, New York: Plenum Press. p. 65-70, 1994.

ZHAO, L.; BURGUERA, E. F.; XU, H. H.; AMIN, N.; RYOU, H. e AROLA, D. D. Fatigue and human umbilical cord stem cell seeding characteristics of calcium phosphate-chitosan-biodegradable fiber scaffolds. *Biomaterials*, v. 31, p. 840-847. 2010.