

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

KEVIN JOHNSON GONÇALVES PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA/PLA CONTENDO PRÓPOLIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Poços de Caldas/MG

2020

KEVIN JOHNSON GONÇALVES PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA/PLA CONTENDO PRÓPOLIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Ciência e Engenharia dos Materiais pela Universidade Federal de Alfenas, Campus Poços de Caldas, MG. Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Tatiana Cristina MacLeod Furtado.

Co-orientadora: Dra. Maria do Socorro de Melo.

Poços de Caldas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca campus Poços de Caldas

Pereira, Kevin Johnson Gonçalves.
P436d Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de
quitosana/PLA contendo própolis para aplicações biomédicas /
Kevin Johnson Gonçalves Pereira. – Poços de Caldas/MG, 2020.
69 f. –

Orientador(a): Tatiana Cristina Mac Leod Furtado.
Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Alfenas, campus Poços de Caldas, 2020.
Bibliografia.

1. Nanopartículas. 2. Flavonóides. 3. Quitosana. I.
Furtado, Tatiana Cristina Mac Leod. II. Título.

CDD – 620.11

KEVIN JOHNSON GONÇALVES PEREIRA

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANA/PLA CONTENDO PRÓPOLIS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

A banca examinadora abaixo-assinada, aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência e Engenharia de Materiais, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Alfenas.

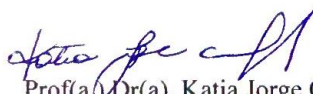
Área de concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais.

Aprovada em: 06 de março de 2020.



Prof(a.) Dr(a). Tatiana Cristina Mac Leod Furtado

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Prof(a.) Dr(a). Katia Jorge Ciuffi

Instituição: Universidade de Franca - UNIFRAN



Prof(a.) Dr(a). Tania Regina Giraldi

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu coração durante essa jornada.

À ciência, por ter me proporcionado amadurecimento, conhecimentos que eu jamais imaginaria e amizades que nunca esquecerei.

À minha mãe, por estar sempre presente, preocupada e me ajudar com coisas fundamentais.

Ao meu pai, por me ajudar nos momentos certos.

Ao meu irmão Stefano Higo, à minha cunhada Amanda Oliveira e ao meu sobrinho Davi, por serem anjos na minha vida e encherem meu coração de amor.

À Prof^a. Tatiana Cristina Mac Leod Furtado, mais que uma orientadora, uma grande amiga; agradeço pelos conhecimentos transmitidos, pelos conselhos e pela empatia sem tamanho.

À Prof^a. Maria do Socorro de Melo, pelos conhecimentos passados e pela paciência para ensinar.

Ao irmão que a pesquisa me concedeu: Thiago Melo Augusto; por ter sido uma pessoa fantástica, me acompanhando durante passos fundamentais do trabalho.

Aos meus grandes amigos conquistados na UNIFAL, por iluminarem a jornada e tornarem todo um processo uma experiência muito mais leve.

Aos professores do PPGCEM e do PPGEQ, por estarem sempre à disposição.

Ao laboratório de Ciências e Engenharia de Materiais, no Campus Poços de Caldas, da Universidade Federal de Alfenas.

Às meninas do laboratório de Alfenas, pela ajuda nas análises de DLS e potencial zeta; e pelo carinho e disposição em ajudar.

Ao pessoal da UFSCar, pela disposição em ajudar.

A todos os técnicos de laboratório da UNIFAL, pela paciência e disposição em ajudar.

O Presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

Para finalizar, agradeço por ter aprendido uma grande lição: os alicerces para o futuro da pesquisa, está na união e no respeito entre as pessoas.

“Devemos crescer em complexidade, quando não em profundidade, e seremos sempre o centro de um horizonte de possibilidades em expansão.”

(HAWKING, 2001, p. 6)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar diferentes formulações de nanopartículas de quitosana e ácido poli-láctico (PLA) incorporadas com própolis através do método de nanoprecipitação para aplicações biomédicas. A associação da própolis às nanopartículas pode gerar resultados interessantes, em função de suas atividades antibacteriana, antioxidante e anti-inflamatória. A própolis foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e submetida ao método colorimétrico para determinar a quantidade de flavonóides totais. As nanopartículas (não-incorporadas e incorporadas) foram caracterizadas por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), Potencial Zeta (em diferentes pHs), FTIR e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Foram realizados ensaios para avaliar a eficiência de encapsulamento de própolis e o perfil de liberação *in vitro* das nanopartículas. Finalmente, foram avaliadas a atividade antimicrobiana das nanopartículas pelo método da difusão em disco e a Concentração Mínima Inibitória (CMI) pelo método de diluição, ambos os testes contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa). No potencial zeta em função do pH, observou-se que as nanopartículas apresentam cargas majoritariamente positivas, sendo que tal resultado é interessante para adesão celular das nanopartículas. Através do FTIR, foi possível identificar alguns componentes presentes na própolis e verificou-se também que as bandas características dos compostos isolados reapareceram nas nanopartículas, indicando que a incorporação da própolis foi bem-sucedida. Os resultados de MEV demonstraram que os tamanhos das partículas estão próximos dos valores obtidos através do DLS (entre 180 e 890 nm), verificou-se também que as nanopartículas foram devidamente formadas, no entanto, com algumas irregularidades em sua forma. A eficiência de encapsulamento de própolis variou entre 76 e 89%. O estudo de liberação mostrou um fenômeno de liberação inicial acelerada nas primeiras 24 horas, esse resultado é interessante para aplicações como tratamento de feridas. Na avaliação antimicrobiana e CMI, as nanopartículas incorporadas com própolis e com o maior teor de quitosana na composição foram as que exibiram a maior atividade antibacteriana, esse resultado foi válido para ambas as cepas. Os resultados sugerem que nanopartículas de quitosana/PLA contendo própolis são sistemas carreadores promissores para aplicações biomédicas.

Palavras-chave: Nanopartículas. Própolis. Ácido poli-láctico. Quitosana. Aplicações biomédicas. Nanoprecipitação.

ABSTRACT

The present study aimed to synthesize different formulations of propolis-loaded chitosan and polylactic acid (PLA) nanoparticles through the nanoprecipitation method for biomedical applications. The association of propolis to the nanoparticles can bring some interesting results, due to its antibacterial, antioxidant, anti-inflammatory activities. Propolis was characterized by Fourier-transformed Infrared Spectroscopy (FTIR) and submitted to the colorimetric method to determine the total flavonoids content. The nanoparticles (non-loaded and loaded) were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential (at different pH values), FTIR and Scanning Electronic Microscopy (SEM). Assays were performed to evaluate encapsulation efficiency of propolis and the *in vitro* release profile of nanoparticles. Finally, the nanoparticles antimicrobial activity by disk-diffusion method and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by microdilution were also evaluated, both tests were performed against *Staphylococcus aureus* (gram-positive) and *Escherichia coli* (gram-negative). In Zeta Potential as function of pH, it was observed that nanoparticles present mostly positive charges, such result is interesting for cell adhesion of the nanoparticles. Through FTIR analysis, was possible to analyze propolis components and it was also found that the characteristic bands of the isolated compounds reappeared in the nanoparticles, indicating that propolis incorporation was successful. The MEV results showed that the particles size is close to the values obtained through DLS (between 180 and 890 nm), it was also found that the nanoparticles were properly formed, however, with some irregularities in their shape. The propolis entrapment efficiency of the samples ranged from 76 to 89%. The release study showed an initial burst release in the first 24 hours, this result is interesting for applications such as wound treatment. In antimicrobial evaluation and MIC, the propolis-loaded nanoparticles with the highest chitosan content in the composition showed the highest antibacterial activity, this result were valid for both strains. The results suggest that propolis-loaded chitosan/PLA nanoparticles are promising drug delivery systems for biomedical applications.

Keywords: Nanoparticles. Propolis. Polilactic acid. Chtiosan. Biomedical Applications. Nanoprecipitation.

FIGURAS

Figura 1 - Mercado global de nanofármacos	16
Figura 2 - Evolução do mercado de nanofármacos expresso em US\$ bilhões.....	16
Figura 3 - Estrutura molecular da quitosana.....	20
Figura 4 - Estrutura molecular do PLA.	23
Figura 5 - Estruturas químicas dos principais tipos de flavonóides.	25
Figura 6 - Estrutura química do CAPE.....	25
Figura 7 - Fluxograma da metodologia de preparo das nanopartículas.....	31
Figura 8 - Potencial zeta em função do pH	40
Figura 9 - Espectro FTIR da própolis.....	42
Figura 10 - Espectros FTIR: Quitosana, PLA e nanopartículas.	44
Figura 11 - Espectros FTIR	45
Figura 12 - MEV	47
Figura 13 - Perfil de liberação de própolis	49
Figura 14 - Atividade antimicrobiana em placas inoculadas com <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Figura 15 - Atividade antimicrobiana em placas inoculadas com <i>Escherichia coli</i>	52
Figura 16 - Concentração mínima inibitória.....	54

TABELAS

Tabela 1 - Amostras de NPs e suas respectivas fases.....	30
Tabela 2 - Resultados de DLS das nanopartículas	36
Tabela 3 - Tamanhos médios e potenciais de aplicação para diferentes tipos de nanopartículas	38
Tabela 4 - Bandas FTIR presentes na própolis.....	43
Tabela 5 - Bandas FTIR presentes nas nanopartículas	45
Tabela 6 - Eficiência de encapsulamento de própolis nas amostras.....	48
Tabela 7 - Aplicações em que a liberação inicial acelerada pode ser favorável ou prejudicial	50
Tabela 8 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	52
Tabela 9 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i>	53
Tabela 10 - Valores de CMI das amostras frente a <i>S. aureus</i>	55
Tabela 11 - Valores de CMI das amostras frente a <i>E. coli</i>	56

SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection – Coleção de cultura do tipo americano
BHI	Brain Heart Infusion
CAPE	Caffeic acid phenetyl ester – Éster fenetil do ácido cafeico
CMI	Concentração mínima inibitória
DLS	Dynamic light scattering – Espalhamento dinâmico de luz
ESTO	European Science and Technology Observatory – Observatório Europeu de Ciência e Tecnologia
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MCA	Medicina Complementar e Alternativa
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NIH	National Institutes of Health – Institutos Nacionais da Saúde
PDI	Polidispersivity index – Índice de polidispersão
PLA	Ácido poli-láctico
PROP	Própolis
QUI	Quitosana
VEGF	Vascular endothelial growth fator – Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVO	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	JUSTIFICATIVA.....	15
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1	NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS	19
4.2	QUITOSANA	20
4.3	PLA – ÁCIDO POLI-LÁCTICO	22
4.4	A PRÓPOLIS	23
4.4.1	Composição química	24
4.4.2	Propriedades biológicas	26
4.4.3	Aplicações em potencial	26
4.4.4	Utilização em nanopartículas	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	MATERIAIS.....	29
5.2	MÉTODOLOGIA EXPERIMENTAL	29
5.2.1	Preparo das nanopartículas.....	29
5.2.2	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	32
5.2.3	Potencial Zeta em função do pH	32
5.2.4	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	32
5.2.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	32
5.2.6	Obtenção da curva padrão de quercetina e determinação da quantidade de flavonoides total na própolis.....	33
5.2.7	Avaliação da eficiência de encapsulamento	34
5.2.8	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	34

5.2.9	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	35
5.2.10	Concentração mínima inibitória (CMI)	35
5.3	RESULTADO E DISCUSSÃO	36
5.3.1	Espalhamento dinâmico de luz (DLS)	36
5.3.2	Potencial zeta em função do pH	39
5.3.3	FTIR	41
5.3.4	MEV.....	46
5.3.5	Quantidade de flavonoides totais da própolis.....	48
5.3.6	Avaliação da eficiência de encapsulamento	48
5.3.7	Estudo de liberação <i>in vitro</i>	49
5.3.8	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	50
5.3.9	Concentração mínima inibitória (CMI)	53
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

Diversos campos da ciência estão direta ou indiretamente correlacionados, e muitas vezes o desenvolvimento científico em uma determinada área, causa impactos em outros setores que se relacionam à mesma. Um exemplo desta relação é entre a biomedicina e a ciência dos materiais. As exigências expressas pela medicina dos dias atuais demandam desenvolvimentos na ciência dos materiais que torne possível a obtenção de materiais com propriedades únicas.

Nesta perspectiva, materiais que tem recebido especial interesse atualmente são os “nanomateriais”. Segundo Mcnamara e Tofail (2016), nanopartículas poliméricas são partículas coloidais sólidas cujo tamanho pode variar entre 10 e 1000 nm. Nanopartículas oferecem muitas vantagens em relação às partículas em escala macro, tal como uma maior relação superfície/volume.

Com o advento dos nanomateriais, surgiu também um termo conhecido como “nanomedicina”. A nanomedicina além de ser um campo relativamente novo da ciência e tecnologia, é um termo cuja definição deve ser devidamente estabelecida. O termo “nanomedicina” refere-se à “medicina possibilitada pela nanotecnologia” em diferentes áreas da medicina, tais como: diagnóstico, terapia ou monitoramento (BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Através da interação com moléculas biológicas em nanoescala, a nanotecnologia abre um vasto campo de pesquisa e aplicações. Interações entre conjuntos moleculares artificiais ou nanodispositivos e biomoléculas podem ser entendidas tanto no meio extracelular como dentro das células humanas. Operar em nanoescala permite explorar propriedades físicas diferentes daquelas que são observadas em escala “micro” ou “macro”. Uma área que tem apresentado um forte desenvolvimento é a de “nanofármacos”, em que nanopartículas são desenvolvidas para a liberação planejada de fármacos dentro do organismo. O uso desses “sistemas carreadores” melhora a biodistribuição do fármaco, direcionando moléculas ativas para tecidos doentes enquanto protege o tecido saudável (BOISSEAU; LOUBATON, 2011).

Quitosana é um polissacarídeo obtido a partir da desacetilação completa ou parcial da naturalmente abundante quitina, conhecida por ser biocompatível, biodegradável e bioativa em tecidos animais e humanos. Recentemente, muita atenção vem sendo direcionada à utilização da quitosana e seus derivados em veículos carreadores de fármacos, aceleradores de cicatrização de feridas e agentes de regeneração de nervos. As características únicas das nanopartículas de quitosana podem fornecer uma maior afinidade com membranas biológicas

negativamente carregadas e liberação com localização planejada *in vivo*. Além disso, nanopartículas de quitosana podem promover efeitos inibitórios (dependendo da dose) na proliferação de várias linhas de células tumorais, enquanto apresenta baixa toxicidade a células hepáticas humanas normais (JEEVITHA; AMARNATH, 2013).

A associação da quitosana com o ácido poli-láctico (PLA) pode formar nanopartículas com propriedades interessantes, pois o PLA apresenta boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade, biodegradabilidade, excelente relação entre propriedades térmicas e mecânicas e alta transparência; o material tem sido amplamente usado em suturas cirúrgicas, sistemas transportadores de fármacos e em engenharia de tecidos (JEEVITHA; AMARNATH, 2013).

A própolis é um produto natural que tem recebido muita atenção atualmente (BARBOSA et al., 2009). Isso se deve, principalmente, às suas diversas propriedades biológicas, tais como: atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante, anticancerígeno, entre outras. Sua composição química apresenta várias substâncias, entre elas: flavonoides, ácidos graxos, álcoois, aminoácidos, vitaminas e minerais (BARBOSA et al., 2009).

A incorporação de substâncias naturais ou sintéticas, que possuam boas propriedades biológicas, em nanopartículas possibilita uma ampla gama de aplicações biomédicas. Visto que estes agentes em escala “nano” possibilitam rotas mais convenientes de administração, menor toxicidade terapêutica, estendem o ciclo de vida do produto e, em última análise, reduzem os custos de assistência médica (ZHANG et al., 2007). Além disso, esses materiais possuem possíveis aplicações muito importantes em biomedicina, tais como: cicatrização de feridas, tratamento de câncer, infecções virais, doenças cardiovasculares, entre outras (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

O objetivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de quitosana e PLA incorporadas com própolis através do método de nanoprecipitação para potenciais aplicações em biomedicina. Além disso, também se objetivou a realização de caracterizações dessas nanopartículas.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a síntese de nanopartículas de quitosana e PLA incorporadas com própolis, com potencial para aplicações biomédicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver nanopartículas com diferentes teores de quitosana/PLA e, para cada teor, preparar nanopartículas incorporadas com própolis;
- b) Caracterizar as nanopartículas através de FTIR e identificar as possíveis interações entre os componentes;
- c) Analisar a morfologia das nanopartículas através de DLS e MEV;
- d) Determinar a estabilidade das nanopartículas através do Potencial zeta e comparar os valores de potencial zeta em diferentes pH;
- e) Realizar testes para analisar a eficiência de encapsulamento das nanopartículas e o perfil de liberação delas;
Avaliar a atividade antimicrobiana das nanopartículas contra as bactérias
- f) *Staphylococcus aureus* (gram-positiva) e *Escherichia coli* (gram-negativa) através dos métodos de difusão em Ágar e Concentração mínima inibitória (CMI).

3 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento científico de tecnologias aplicadas à medicina se mostrou, ao longo das últimas décadas, um campo de pesquisa promissor. De acordo com Flynn e Wei (2005), o número de empregados do ramo de biotecnologia, nos EUA, em 1992 era de aproximadamente 79.000 pessoas e em 2001, esse número cresceu para aproximadamente 191.000. Observa-se então que em 9 anos, houve um crescimento de aproximadamente 141,77% na quantidade de empregos sustentados pelo mercado de biotecnologia nos EUA.

Nas últimas décadas, houve um crescimento progressivo no número de produtos terapêuticos baseados em nanopartículas disponíveis comercialmente. Uma pesquisa global conduzida pelo Observatório Europeu de Ciência e Tecnologia (ESTO – European Science and Technology Observatory) em 2006 mostrou que mais de 150 companhias estavam desenvolvendo produtos em nanoescala voltados para aplicações biomédicas (ZHANG et al., 2007).

De acordo com Morigi et al. (2012), em 2007 a média de investimentos em nanotecnologia foi de US\$11.51 milhões e em 2009 foi de US\$ 8.6 milhões. No entanto, o fato curioso é que houve um crescimento considerável na porcentagem de investimentos em nanotecnologia voltada para saúde.

De acordo com os Institutos Nacionais da Saúde (NIH - National Institutes of Health), a nanotecnologia começará a produzir benefícios médicos significativos nos próximos anos. Adicionalmente, pesquisas de mercado realizadas pela BCC Research indicam que o mercado global de nanomedicina alcançou valores de US\$ 63,8 bilhões em 2010 e US\$ 72,8 bilhões em 2011 (NGUYEN, 2013).

A participação de mercado de nanofármacos representou 15% do mercado farmacêutico total em 2014 e foi previsto que esta porcentagem crescerá para 22% em 2019. Em adição, a taxa de crescimento anual composta média para esta classe de produtos é estimada em 14,5%, que representa uma boa taxa se comparada aos 5,5% para produtos farmacêuticos que não são em escala nano (RAGELLE et al., 2016). A figura 1 apresenta gráficos que ilustram os dados obtidos pela BCC Research sobre o mercado global de produtos nanofarmacêuticos.

Figura 1 - Mercado global de nanofármacos



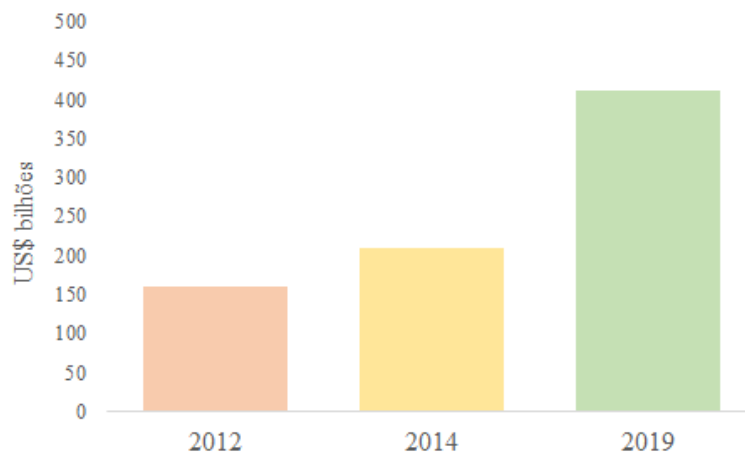
Fonte: Adaptado de Ragelle et al. (2016).

Legenda: a) Mercado global farmacêutico de 2014 em US\$ bilhões.

b) Taxa de crescimento anual composta média para produtos farmacêuticos em escala nano e não-nano.

Embora exista uma grande oportunidade de crescimento futuro, o mercado de nanofármacos já está bem estabelecido para várias indicações terapêuticas. Adicionalmente, a empresa de pesquisa BCC Research avaliou o mercado global de nanofármacos em US\$ 209 bilhões no ano de 2014 e estimou que em 2019 este valor chegaria a US\$ 412 bilhões (RAGELLE et al., 2016). O gráfico apresentado na figura 2 ilustra o desenvolvimento desse mercado.

Figura 2 - Evolução do mercado de nanofármacos expresso em US\$ bilhões



Fonte: Adaptado de Ragelle et al. (2016).

O papel da quitosana na indústria farmacêutica tem sido extensivamente explorado. Isso se deve não apenas pelas propriedades biológicas dela, que já a tornam um material

altamente aplicável no organismo, mas também a algumas outras propriedades intrínsecas que fazem da mesma um material muito atrativo para utilização em sistemas carreadores (AHSAN et al., 2018).

De acordo com a Global Industry Analysts Inc. (2014 apud GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017) a produção de quitosana está diretamente relacionada à indústria pesqueira, uma vez que ela é obtida a partir da desacetilação da quitina que é extraída da carapaça de crustáceos e, nessa perspectiva, países latino-americanos, com costas no Oceano Pacífico, consolidam cerca de 41% das exportações mundiais de camarão.

A Global Industry Analysts Inc. (2014 apud GÓMEZ-RÍOS; BARRERA-ZAPATA; RÍOS-ESTEPA, 2017) realizou uma projeção de que o mercado global da quitosana excederia 118.000 toneladas até 2018. Observa-se que, além de suas propriedades que possibilitam aplicações na indústria farmacêutica, a quitosana é um material de fácil acesso e abundante.

O PLA é biocompatível, considerado seguro para o contato direto com o tecido biológico e é um dos poucos materiais degradáveis aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) e muitas outras agências regulatórias (HADASHA; BEZUIDENHOUT, 2017). Em relação aos aspectos econômicos, a Markets Insider anunciou que a Research and Markets estimou que o tamanho de mercado do PLA alcançará os US\$ 6,5 bilhões de dólares em 2025 (MARKET INSIDER, 2017 apud FAHIM; CHBIB; MAHMOUD, 2019).

A própolis vem sendo amplamente utilizada em aplicações medicinais devido às suas diversas propriedades biológicas (SFORCIN, 2016). O Brasil é atualmente o terceiro maior produtor de própolis do mundo, perdendo apenas para a Rússia e China. Embora represente entre 10 e 15% da produção global, o Brasil atende cerca de 80% da demanda do mercado japonês. Sendo que, dentro da produção brasileira, estimou-se que o estado de Minas Gerais produz mais de 35 toneladas de própolis por ano (BERRETTA et al., 2017).

Com base em todos os dados fornecidos pelas pesquisas realizadas na literatura, observa-se que há um interesse crescente não só pelo desenvolvimento científico de nanotecnologias, mas também, pela utilização de nanomateriais para aplicação na área da saúde.

Entretanto, na produção de um nanofármaco, é de suma importância que seus constituintes sejam selecionados com base não só nos seus aspectos funcionais (aplicabilidade e benefícios ao organismo), mas também em aspectos econômicos, sociais e ambientais; de modo que estes constituintes sejam viáveis financeiramente e que sua utilização seja sustentável.

Na literatura, existem alguns poucos estudos com nanopartículas de quitosana/PLA, tais como os realizados por Dev et al. (2010), Jeevitha e Amarnath (2013) e Yuan et al. (2008). No entanto, não existem artigos publicados nos quais essas nanopartículas foram preparadas para a liberação de alguma substância de origem natural, como a própolis.

Sendo assim, de uma perspectiva científica, o preparo de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação de própolis e estudo de suas propriedades é interessante, pois dessa forma, será possível avaliar quais serão as características desse material enquanto sistema de liberação e como será a interação dos componentes com uma substância de origem natural (a própolis).

Através da revisão na literatura sobre aspectos funcionais, econômicos e científicos da quitosana, do PLA e da própolis, pôde-se constatar que todos os componentes são promissores para o desenvolvimento de nanopartículas voltadas para aplicações biomédicas. Além disso, verificar possíveis interações entre suas propriedades na forma de nanopartículas pode gerar resultados interessantes.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

Nanomedicina pode ser definida como o desenvolvimento de diagnósticos e/ou terapias em escala nanométrica, o que proporciona vantagens devido ao alto grau de transporte e entrega de espécies ativas com mediação de sua navegação dentro dos sistemas biológicos para o tratamento, prevenção e diagnóstico de doenças (ELSABAHY; WOOLEY, 2012). Para tal, são utilizados os materiais conhecidos como nanopartículas.

Nanopartículas podem ser construídas de vários tipos diferentes de materiais e podem comportar uma ampla gama de componentes para aplicações biomédicas, como quimioterápicos, proteínas, agentes de contraste, entre outros. Em particular, nanopartículas poliméricas têm recebido grande atenção atualmente devido à elevada versatilidade que suas estruturas apresentam para empacotar e entregar cargas ao campo de ação desejado, ou de liberar estas cargas em resposta a estímulos específicos (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

As nanopartículas poliméricas são preparadas a partir de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis em tamanhos entre 10 e 1000 nm. Dentro das mesmas, o fármaco é dissolvido, encapsulado ou anexado à matriz da nanopartícula. Em adição, dependendo do método de preparo das nanopartículas, podem ser obtidas nanoesferas ou nanocápsulas. Nanocápsulas são sistemas nos quais o fármaco é confinado em uma cavidade, cercado por uma única membrana polimérica, enquanto nanoesferas são sistemas matriciais nos quais o fármaco é uniformemente e fisicamente disperso (NAGAVARMA; HEMANT; AYZAZ, 2012).

Existem alguns fatores que são considerados determinantes na eficácia das nanopartículas, baseados em seus atributos físicos, como por exemplo: tamanho, forma e flexibilidade. Além disso, suas características químicas também são determinantes; incluindo, por exemplo, a incorporação de ligantes ativos para o reconhecimento e ativação dos receptores biológicos (ELSABAHY; WOOLEY, 2012).

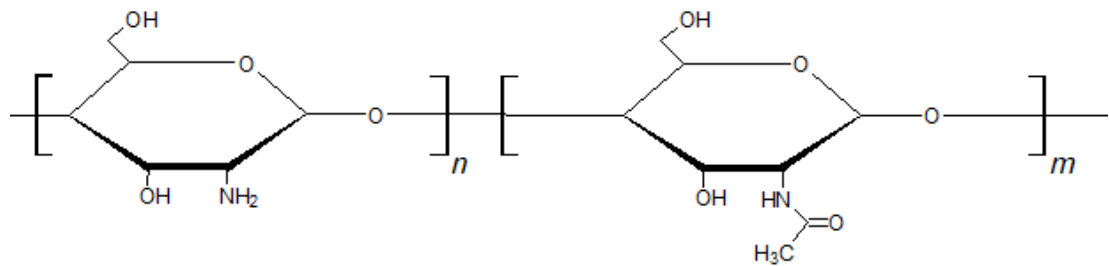
Nanopartículas poliméricas são materiais promissores para a liberação de fármacos devido à fácil manipulação das mesmas para desenvolver sistemas carreadores com o objetivo de entregar fármacos a um alvo específico, sendo que tal vantagem promove a segurança do fármaco até o seu alvo (NAGAVARMA; HEMANT; AYZAZ, 2012).

4.2 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo completamente ou parcialmente desacetilado da naturalmente abundante quitina. É conhecido por ser biocompatível, biodegradável e bioativo em tecidos, tanto de animais quanto de seres humanos (JEEVITHA; AMARNATH, 2013). Essa compatibilidade biológica apresentada pela quitosana justifica suas várias aplicações no campo da biomedicina.

No que se refere à sua estrutura molecular, a quitosana é formada por copolímeros de glucosamina (2-amino-2-desoxi-d-glucose) e N-acetilglucosamina (2-acetamido-2-desoxi-d-glucose) unidos por ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (TAVARES, 2011, p.12). A estrutura básica da quitosana é apresentada na figura 3.

Figura 3 - Estrutura molecular da quitosana



Fonte: Do autor.

Legenda: Se $m \geq 40\%$, será quitina; se $m < 40\%$ será quitosana.

Recentemente, muita atenção tem sido direcionada à quitosana como sistema de liberação de fármaco, acelerador de cicatrização de feridas e como agente de regeneração de nervos. As nanopartículas de quitosana apresentam características únicas que podem prover uma maior afinidade com membranas biológicas negativamente carregadas e liberação em regiões específicas *in vivo*. Além disso, nanopartículas de quitosana podem provocar efeitos inibitórios na proliferação de várias linhagens tumorais, dependendo da dose (JEEVITHA; AMARNATH, 2013).

As propriedades da quitosana tornam possível sua combinação com outros polímeros, com a proposta de melhorar a performance do material em sua aplicação (PRABAHARAN, 2015). Registros na literatura evidenciam a sua versatilidade como material de matriz em nanopartículas, pois é utilizada para a liberação de diferentes fármacos, o que possibilita uma ampla gama de aplicações. Mitra et al. (2001) desenvolveu nanopartículas de quitosana encapsuladas com o conjugado dextrano-doxorrubicina para a liberação do fármaco

direcionada a tumores. Os resultados obtidos indicaram que as nanopartículas apresentam potencial para aplicação em quimioterapia para câncer.

Wilson et al. (2010) prepararam nanopartículas de quitosana como um sistema de liberação de tacrina, fármaco utilizado no tratamento de Alzheimer. As partículas preparadas apresentaram boa capacidade de encapsulamento do fármaco e os estudos de liberação *in vitro* mostraram uma liberação lenta e contínua do medicamento (após o efeito de liberação imediata).

Garg, Rath e Goyal (2015) prepararam nanopartículas de quitosana para administração via pulmonar de medicamentos antituberculosos: isoniazida e rifampicina. No estudo, as nanopartículas foram preparadas com sucesso, com distribuição média de tamanho de aproximadamente 230 nm. Foi concluído que nanopartículas de quitosana podem ser exploradas como uma ferramenta prospectiva para a administração de medicamentos nos tecidos pulmonares para o tratamento de tuberculose.

Observa-se na literatura que o potencial da quitosana para formar nanopartículas vem sendo amplamente explorado e que resultados promissores foram obtidos nesses estudos. No entanto, é importante constatar que a versatilidade da quitosana reside também no fato de que a mesma pode ser combinada com outros polímeros, a fim de formar nanopartículas com propriedades melhoradas.

Zhang (2008) preparou nanopartículas de quitosana enxertada em poli(etileno glicol) para administração nasal de insulina, obtendo tamanhos de partículas entre 150 e 300 nm. Os resultados foram satisfatórios, uma vez que a absorção nasal de insulina foi melhor nas nanopartículas de quitosana/poli(etileno glicol) em comparação com a suspensão de quitosana/poli(etileno glicol)/insulina e solução controle de insulina.

Pawar, Douroumis e Boateng (2012) desenvolveram nanopartículas de poli(ácido metacrílico)/quitosana/poli(etileno glicol), com a intenção de obter uma elevada capacidade de encapsulamento através da copolimerização de diferentes polímeros biodegradáveis. O tamanho das nanopartículas obtidas variou de 190 a 450 nm. Como resultado, estas nanopartículas apresentaram um grande potencial como sistema de administração controlada de medicamentos por via oral.

Aluani et al. (2017) desenvolveram nanopartículas de quitosana/alginato carregadas com quercetina. Foram feitas diferentes amostras com diferentes proporções de quitosana e alginato. No estudo, verificou-se que os efeitos antioxidantes da quercetina foram maiores nas nanopartículas que possuíam a maior concentração de quitosana se comparadas às nanopartículas com quantidade predominante de alginato.

4.3 PLA – ÁCIDO POLI-LÁCTICO

De acordo com Drumright, Gruber e Henton (2000), o Ácido Poli-láctico (PLA) é um polímero que pertence à família dos poliésteres alifáticos, comumente feitos a partir de α -hidroxiácidos, sendo considerado um material biodegradável e compostável. Segundo Lasprilla et al. (2012), o PLA possui um extenso perfil de propriedades mecânicas e é um termoplástico com elevada biocompatibilidade e biodegradabilidade.

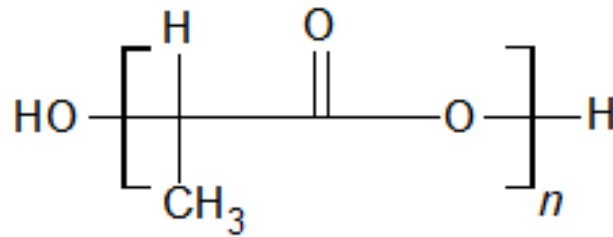
A classe mais amplamente utilizada de polímeros biocompatíveis e biodegradáveis é a dos poliésteres alifáticos, aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), dentre estes materiais encontra-se o PLA (JEEVITHA; AMARNATH, 2013). A FDA é uma agência federal que faz parte do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos, sendo responsável pela proteção e promoção da saúde pública através do controle e monitoramento da segurança alimentar, fármacos, vacinas, entre outros. Adicionalmente, de acordo com Luz et al. (2017), a FDA aprovou a utilização de alguns materiais biodegradáveis em humanos, sendo o PLA um desses materiais aprovados.

O PLA apresenta propriedades interessantes, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas excelentes. Tais propriedades tornaram o material adequado até mesmo para aplicações voltadas à engenharia de tecidos (JEEVITHA; AMARNATH, 2013). Além disso, nanopartículas de PLA apresentam aplicações em potencial na medicina, como sistemas carreadores de fármacos, proteínas e genes. Sendo que essas nanopartículas de PLA apresentam muitos benefícios, tais como liberação terapêutica sustentável de fármacos durante longos períodos, devido à sua matriz polimérica permitir o controle da cinética da liberação de fármaco (LUZ et al., 2017).

De acordo com Lasprilla et al. (2012), o PLA é amplamente utilizado em aplicações biomédicas pois une excelentes propriedades a um baixo custo. Além disso, pode ser combinado com outros componentes (poliméricos ou não) para dar origem a materiais com propriedades diferenciadas.

O PLA é um polímero biodegradável altamente versátil, podendo ser feito sob medida em diferentes classes de resina para posterior processamento em um amplo espectro de produtos. A estrutura molecular do PLA está esquematicamente ilustrada na figura 4.

Figura 4 - Estrutura molecular do PLA



Fonte: Do autor.

Atualmente, existem estudos que comprovam que o PLA é um material versátil e que pode apresentar uma boa interação com a quitosana na forma de nanopartículas, como evidenciado por Jeevitha e Amarnath (2013) e Yuan et al. (2008).

Segundo com Jeevitha e Amarnath (2013), a combinação das funções bioativas da quitosana com as boas propriedades mecânicas do PLA para gerar compostos com novas propriedades é uma abordagem interessante. Além disso, no estudo desenvolvido por Yuan et al. (2008), o PLA foi combinado com quitosana, melhorando assim a capacidade de carregamento de fármaco nas nanopartículas.

4.4 A PRÓPOLIS

A própolis é um dos muitos produtos naturais utilizados em medicina ao longo dos séculos, tendo sido administrada de diversas formas diferentes. A própolis é uma substância complexa e é coletada por abelhas em diversas fontes distintas presentes na natureza. Em adição, nas colmeias secreções salivares são adicionadas pelas abelhas à composição da própolis (PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

A própolis é uma mistura resinosa e de cor escura, que as abelhas coletam em plantas, flores, caules e fissuras nas cascas de muitas espécies de árvores. Posteriormente, esse material é transportado até a colmeia, onde é combinado com cera de abelha, produzindo assim uma mistura fortemente adesiva e que ao longo dos séculos tem sido utilizada na medicina tradicional (ANDRADE et al., 2017).

Adicionalmente, de acordo com Andrade et al. (2017), as propriedades terapêuticas da própolis são bem conhecidas na medicina popular devido às suas atividades antitumorais, antissépticas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas.

Constatou-se que a aplicação da própolis no tratamento de câncer e de outras doenças é dificultada devido à sua baixa solubilidade em meio aquoso. Sistemas de transporte de

fármacos baseados em nanopartículas têm o potencial de tornar agentes hidrofóbicos (como a própolis) dispersáveis em meio aquoso, assim resolvendo as dificuldades geradas pela baixa solubilidade da própolis (SFORCIN, 2016).

Além disso, o conjunto das propriedades biológicas da própolis a tornam uma substância com uma ampla gama de possibilidades no que se refere as aplicações biomédicas. De acordo com Suárez, Zayas e Guisado (2005), muitos estudos provaram a eficácia da própolis contra vírus, bactérias e fungos; e como um agente anti-inflamatório. A própolis é conhecida como um antibiótico natural capaz de se opor a bactérias patogênicas, agindo de forma contrária aos antibióticos convencionais, que destroem toda a flora natural do corpo.

Adicionalmente, as aplicações biomédicas da própolis não são apenas internas ao corpo humano, visto que ela é utilizada também no ambiente externo do corpo. Segundo Barbosa et al. (2009), a utilização da própolis no tratamento de lesões cutânea apresenta resultados promissores.

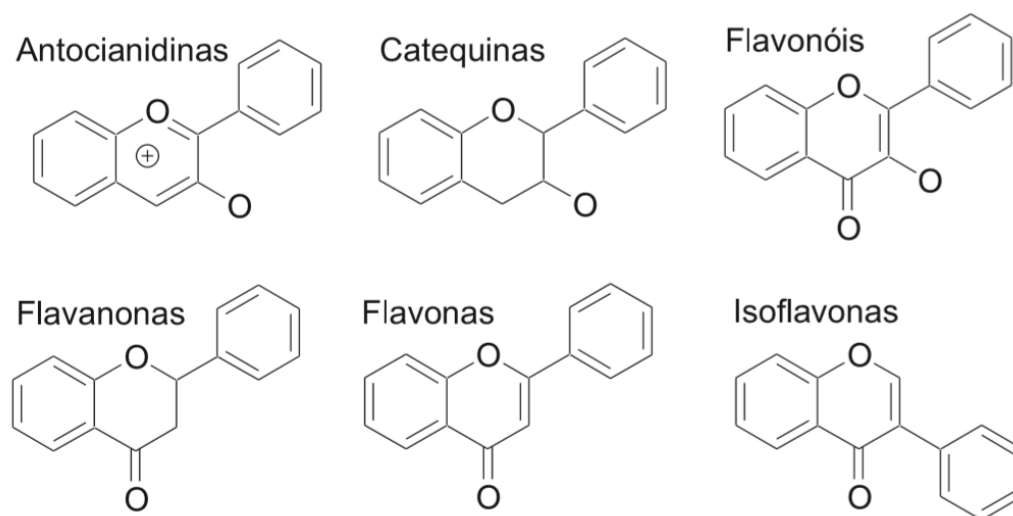
Suárez, Zayas e Guisado (2005) registram muitas outras funções da própolis, tais como: suavização dos vasos sanguíneos, promoção da reprodução do tecido, aceleração da cicatrização de ferimentos, aprimoramento das funções do estômago e dos intestinos, superação da constipação, diminuição de gordura sanguínea e açúcar no sangue e promoção da morte de bactérias, fungos e vírus.

4.4.1 Composição química

Caracteristicamente, a própolis é uma substância lipofílica, que possui um cheiro agradável aromático e que varia de cor de acordo com a fonte e com o tempo. Entre os tipos de substâncias químicas presentes na própolis estão ceras, resinas, bálsamos, óleos aromáticos e etéreos, pólen e outras matérias orgânicas. A proporção dessas substâncias depende do local e época de coleta (MARCUCCI, 1995).

No que se refere à composição química, Oryan, Alemzadeh e Moshiri (2018) relata que flavonoides, fenilpropanóides, ácido cinâmico e seus ésteres, e glicerídeos são compostos importantes presentes na própolis. Os compostos aromáticos presentes na própolis são os responsáveis por suas atividades antibacteriana, antimicrobiana e anti-inflamatória. A figura 5 apresenta as estruturas químicas dos principais tipos de flavonóides.

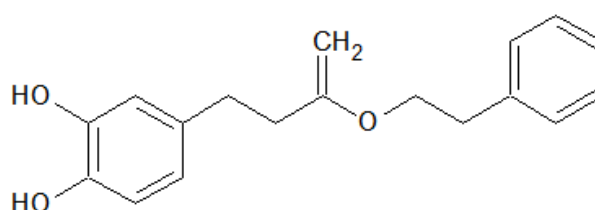
Figura 5 - Estruturas químicas dos principais tipos de flavonóides



Fonte: Março, Poppi e Scarminio (2008, p. 1218).

Os constituintes característicos da própolis encontrada em regiões temperadas são flavonoides. Adicionalmente, éster fenetil do ácido cafeico (CAPE - Caffeic Acid Phenethyl Ester) é um importante constituinte da própolis de regiões temperadas com amplas atividades biológicas (HUANG et al., 2014). De acordo com Kabala-dzik et al. (2017), o CAPE é um polifenol que além de possuir boas propriedades biológicas, já apresentou eficácia contra alguns tipos de células cancerígenas. A figura 6 apresenta a estrutura química do CAPE.

Figura 6 - Estrutura química do CAPE



Fonte: Do autor.

É importante observar que a própolis é constituída por diversas substâncias químicas que contribuem para suas atividades biológicas que, por sua vez, são responsáveis por seu potencial em aplicações biomédicas. De acordo com Oryan, Alemzadeh e Moshiri (2018), é evidente que a própolis é capaz de melhorar a cicatrização de feridas, mas deve ser considerado que a composição química dela é fundamental, pois desempenha um papel importante nesse processo.

4.4.2 Propriedades biológicas

Os flavonoides presentes na própolis apresentam um amplo espectro de propriedades biológicas, tais como efeitos antimicrobianos, antivirais e anti-inflamatórios (HUANG et al., 2014). No estudo realizado por Wojtyczka et al. (2013), observou-se que a própolis polonesa tem o potencial de reduzir o crescimento bacteriano e prevenir a formação de biofilme. Nesse estudo foram realizadas análises por cromatografia líquida de alta eficiência, que evidenciaram a presença de quantidade significativa de ácidos fenólicos e flavonóides.

Os antioxidantes são principalmente aplicados para tratar estresses oxidativos que ocorrem após queimaduras. Sob condições normais, metabolismos celulares geram radicais livres após queimaduras. Essa formação de radicais livres na pele pode prejudicar diretamente a função de alguns aspectos da membrana celular ou pode iniciar uma cascata de sinalização inflamatória que resulta na formação de números mediadores de lesão celular. Adicionalmente, os radicais livres são os causadores dos eventos fisiopatológicos observados após uma queimadura. Sendo assim, a aplicação de compostos antioxidantes tem sido sugerida como positiva na redução de lesões associadas a queimaduras. A própolis pode desempenhar um papel fundamental no tratamento de tais feridas de pele, visto que ela exibe amplas propriedades antioxidantes (ORYAN; ALEMZADEH; MOSHIRI, 2018).

A Kujumgiev et al. (1999) realizaram um estudo para avaliar as atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais de amostras de própolis provenientes de diferentes regiões. Como resultado do trabalho, foi observado que apesar das grandes diferenças na composição química entre as amostras de própolis de diferentes localidades geográficas, todas as amostras exibiram atividades antibacteriana e antifúngica. Além disso, é importante constatar que a maioria das amostras apresentaram atividade antiviral.

4.4.3 Aplicações em potencial

No estudo realizado por Martin et al. (2013) foram investigados os efeitos da própolis brasileira na inflamação e cicatrização de córnea, para isso foram realizados testes *in vivo* com ratos Wistar adultos. A própolis aplicada topicamente acelerou a cicatrização e reduziu a resposta inflamatória após queimaduras alcalinas induzidas por nitrato de prata nos ratos. Provando assim, que a aplicação tópica de própolis na superfície ocular pode ser uma boa alternativa para a prevenção de condições que podem levar até mesmo à cegueira.

A resistência aos regimes convencionais de cura do câncer tem atraído atenção para novas abordagens para o tratamento da doença. A medicina complementar e alternativa (MCA) tem ganhado espaço como uma estratégia de apoio. A própolis como uma MCA emergente demonstrou eficácia contra uma variedade de cânceres, como por exemplo: de cabeça e pescoço, de cérebro e medula espinhal, no sangue, de pele, de mama, entre outros. A própolis provoca resposta antitumoral sozinho ou em conjunto com outros medicamentos (PATEL, 2015).

Demir et al. (2015) realizaram um estudo objetivando avaliar os efeitos do extrato etanólico de própolis de origem turca na linhagem celular (A549) de câncer no pulmão. Os resultados obtidos foram satisfatórios, indicando que a própolis turca foi capaz de reduzir a proliferação das células cancerígenas.

De acordo com Oryan, Alemzadeh e Moshiri (2018), a própolis exibe um grande potencial na cicatrização de feridas na pele, podendo causar a redução da formação de cicatrizes, redução no tempo de cicatrização e reparo tecidual. Adicionalmente, a própolis é uma substância adequada na formação de biofilme em tratamento de feridas, essa característica contribui positivamente para sua atividade cicatrizante, uma vez que a formação de biofilme é um fator altamente importante na cicatrização de feridas.

4.4.4 Utilização em nanopartículas

Nascimento et al. (2016) sintetizaram nanopartículas poliméricas de policaprolactona/plurônico carregadas com extrato de própolis vermelha através do método de nanoprecipitação. Os tamanhos de partículas obtidos variaram entre 200 e 800 nm. A matriz copolimérica utilizada no estudo foi capaz de encapsular com sucesso os diferentes flavonoides presentes no extrato de própolis vermelha.

Ong et al. (2017) prepararam diferentes formulações nanopartículas de quitosana carregadas com própolis e analisaram suas propriedades antimicrobiana e antibiofilme contra *Enterococcus faecalis* (bactéria comum associada a infecções hospitalares). Uma das formulações desenvolvidas apresentou parâmetros físico-químicos ideais e inibiu o crescimento bacteriano, bem como a formação de biofilme pelas bactérias.

Machado et al. (2019) desenvolveram nanopartículas de própolis direcionadas para o tratamento de mastite bovina. No estudo, as nanopartículas apresentaram potencial antimicrobiano contra cepas de *Staphylococcus aureus*. Mesmo assim, verificou-se que, nas

diferentes formulações obtidas, as amostras apresentavam moderados efeitos citotóxicos à linhagem de células epiteliais mamárias (MAC-T).

Observa-se que a utilização da própolis em sistemas de liberação na forma de nanopartículas é uma abordagem promissora, uma vez que estudos demonstram que a mesma mantém seu potencial antibacteriano e que, além disso, pode ser encapsulada com sucesso por matrizes poliméricas, sugerindo assim, uma boa interação com as mesmas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAIS

Para o prepara das nanopartículas, foi utilizada quitosana de médio peso molecular (Sigma-Aldrich, EUA) e PLA (Mn 116848, polidispersividade: 1.67) cedido pela Profa. Dra. Lucia Helena Innocentini Mei da Universidade Estadual de Campinas.

Na solubilização da quitosana foi utilizado ácido acético glacial (Proquímios). Enquanto isso, o PLA foi solubilizado com diclorometano (DCM) (Fraction X). O emulsificante utilizado para formar as emulsões foi o Tween 80® (Fagron, Brasil).

No método colorimétrico, foi utilizado acetato de potássio (Êxodo Científica), cloreto de alumínio (Synth) e quercetina (Pharma nostra). Nas avaliações antimicrobianas, foram utilizados caldo Brain Heart Infusion (TM Media) e ágar Mueller-Hinton (Kasvi). Foram utilizadas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538) e gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 8739).

A própolis verde foi fornecida pelo Professor Edivaldo Aparecido Nunes Martins do Departamento de Medicina Veterinária do Instituto Federal de Ensino, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Muzambinho. O preparo do extrato foi realizado no laboratório de polímeros usando a metodologia descrita pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 3, DE 19 DE JANEIRO DE 2001.

5.2 MÉTODOLOGIA EXPERIMENTAL

5.2.1 Preparo das nanopartículas

O método de preparo utilizado foi de nanoprecipitação. O fluxograma foi baseado no procedimento utilizado por Yuan et al. (2008) e a relação entre os reagentes foi baseada nos estudos realizados por Castro (2017). Foi previamente preparada uma solução aquosa de ácido acético (1% v/v) contendo uma gota do emulsificante Tween 80® a cada 100 ml da solução.

Foram sintetizadas nanopartículas em três proporções diferentes de PLA e quitosana (1PLA : 0,25QUI; 1PLA : 0,50QUI e 1PLA : 0,75QUI). Na tabela 1, são apresentadas, para cada amostra, as soluções que foram feitas para a fase orgânica e para a fase aquosa.

Tabela 1 - Amostras de NPs e suas respectivas fases

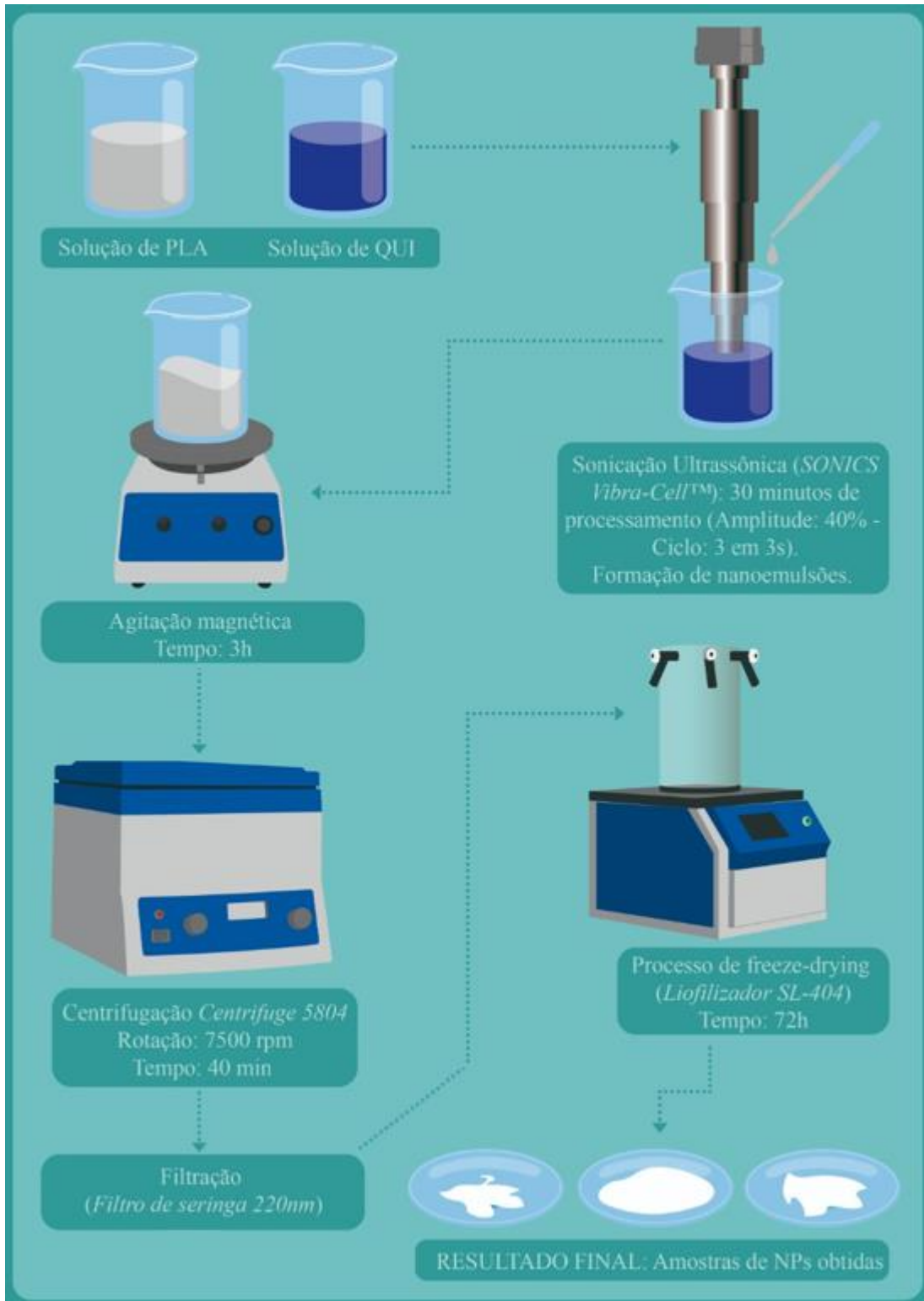
Partículas	Proporção dos componentes	Fase orgânica	Fase aquosa
PLA:QUI 1	1 PLA : 0,25 QUI	50 mg de PLA foi dissolvido em 5 mL de DCM	12,5 mg de quitosana foi solubilizada em 30 mL da solução de ácido acético
PLA:QUI 2	1 PLA : 0,50 QUI	50 mg de PLA foi dissolvido em 5 mL de DCM	25 mg de quitosana foi solubilizada em 30 mL da solução de ácido acético
PLA:QUI 3	1 PLA : 0,75 QUI	50 mg de PLA foi dissolvido em 5 mL de DCM	37,5 mg de quitosana foi solubilizada em 30 mL da solução de ácido acético

Fonte: Do autor.

Para preparar as amostras incorporadas, foi feita uma solução etanólica de 12,5 mg/ml da própolis e, posteriormente, foi adicionada uma alíquota de 0,96 ml (12 mg) da solução à fase orgânica (solução de PLA) no início do procedimento de preparo, isto é, antes da sonicação ultrassônica.

A figura 7 apresenta um fluxograma ilustrando a metodologia empregada para sintetizar as nanopartículas a partir das soluções apresentadas na tabela 1.

Figura 7 - Fluxograma da metodologia de preparo das nanopartículas



Fonte: Do Autor.

5.2.2 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

As medições dos tamanhos médios das nanopartículas de quitosana/PLA puras (PLA:QUI 1, PLA:QUI 2 e PLA:QUI 3) e incorporadas com propólis (PLA:QUI 1 + PROP, PLA:QUI 2 + PROP e PLA:QUI 3 + PROP) em suspensão foram obtidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

As análises foram realizadas no laboratório da escola de farmácia da Universidade Federal de Alfenas, no campus de Alfenas. O equipamento utilizado para a realização da análise foi o Malvern Zetasizer Nano ZS particle analyzer, da Malvern Instruments Ltd. Para a realização da leitura, 1 mg de cada amostra foi suspensa em 1 mL de água destilada. Os gráficos de DLS para cada amostra são apresentados no Anexo A.

5.2.3 Potencial Zeta em função do pH

O equipamento utilizado para as medições de potencial zeta das amostras de nanopartículas puras (PLA:QUI 1, PLA:QUI 2 e PLA:QUI 3) e incorporadas com propólis (PLA:QUI 1 + PROP, PLA:QUI 2 + PROP e PLA:QUI 3 + PROP) foi o mesmo descrito no item 5.2.2. Nas análises, 9 mg de cada amostra foi suspensa em 30 ml de água Mili-Q sob agitação de um dispersor Ultra-Turrax T-25 IKA por 2 minutos. O ajuste de pH das amostras foi realizado utilizando-se soluções de NaOH 0,01 M e HCl 0,01 M.

5.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi usada para caracterizar a estrutura de todas as amostras e para identificar as interações existentes entre os constituintes das nanopartículas sintetizadas. As amostras foram analisadas através da utilização de um espectrofotômetro FTIR acoplado a um acessório ATR da Agilent Technologies modelo Cary 630. Os espectros foram coletados na faixa de 650 a 4000 cm^{-1} .

5.2.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foi realizada a microscopia eletrônica de varredura para analisar a morfologia das nanopartículas. Para tal, foram utilizadas as suspensões das nanopartículas obtidas após o processo de filtragem. As amostras foram depositadas em stubs (porta amostras de alumínio),

submetidas a secagem e, posteriormente, recobertas com ouro no equipamento marca Balzers, modelo Sputter Coater SCD 004.

As fotomicrografias foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura FEI Magellan 400 L, do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

5.2.6 Obtenção da curva padrão de quercetina e determinação da quantidade de flavonoides total na própolis

De acordo com Bag, Devi e Bhaigyabati (2015), estudos relatam que a quercetina, que é um flavonoide natural, é uma referência adequada para a determinação do conteúdo de flavonoides totais. O método colorimétrico com cloreto de alumínio utilizado na obtenção da curva padrão e determinação da quantidade flavonoides na própolis foi baseado no método proposto por Chang et al. (2002).

Para a obtenção de uma curva padrão que relaciona a absorvância de amostras à concentração de flavonoides presentes em cada uma, foram feitas seis soluções etanólicas de quercetina pelo método de diluição em série: 100, 80, 60, 40, 20 e 10 $\mu\text{g/mL}$.

Em um tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL de solução de quercetina de concentração conhecida, 0,1 mL de solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) 10%, 0,1 mL de solução de acetato de potássio (CH_3COOK) 1M e 3,8 mL de água destilada.

O branco consistiu em um tubo com todos os reagentes, exceto pela solução de quercetina, pois esta foi substituída por 0,5 mL de etanol. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 30 minutos antes da realização do ensaio.

As amostras de quercetina foram então colocadas em cubetas de quartzo e analisadas a absorvância em 425 nm em um espectrofotômetro UV-VIS modelo Cary-60 (Agilent Technologies). Finalmente, foi construído um gráfico de concentração em função dos valores de absorvância ($\lambda = 425 \text{ nm}$). Através do gráfico foi obtida a equação da reta por regressão linear e o coeficiente de correlação (R^2). A curva de calibração está apresentada no Anexo B.

A quantidade de flavonoides totais da própolis foi feita através do método colorimétrico, utilizando a equação da curva de calibração descrita acima. Para a determinação da quantidade de flavonoides total na amostra de própolis, foi utilizada uma alíquota de 0,5 mL de solução etanólica da própolis (1 mg/mL).

5.2.7 Avaliação da eficiência de encapsulamento

As nanopartículas de quitosana/PLA incorporadas (QUI:PLA 1 + PROP, QUI:PLA 2 + PROP e QUI:PLA 3 + PROP) suspensas foram centrifugadas a 10.000 RPM por 20 minutos (micro-centrifuga Centrifuge ECEN-205). Posteriormente, foram coletadas alíquotas de 0,5 mL de sobrenadante de cada amostra e submetidas ao método colorimétrico descrito no item 5.2.7. As concentrações do conteúdo de flavonoides das amostras foram obtidas com o auxílio da curva de calibração de quercetina (Anexo C), sendo possível calcular a concentração de flavonoides livre no sobrenadante, indicando a quantidade de propólis que foi incorporado na nanopartícula. A equação proposta por Tagliari et al. (2012) foi utilizada para definir a eficiência de encapsulamento (EE%):

$$EE (\%) = \frac{C_t - C_s}{C_t} \times 100$$

Em que: C_t = Concentração total de flavonoides nas nanopartículas; C_s = Concentração de flavonoides livres no sobrenadante (após centrifugação).

5.2.8 Estudo de liberação *in vitro*

Para a avaliação do perfil de liberação de propólis, 4 mg das nanopartículas incorporadas foram suspensas em 1 mL de água destilada. Posteriormente, as suspensões foram depositadas dentro de membranas de diálise com corte molecular de 3,5 kDa. Finalmente, as membranas foram fechadas e suspensas em uma solução tampão fosfato-salino (PBS – Phosphate-buffered saline) de pH 7,4 dentro de tubos falcon.

Os tubos falcon foram fechados e colocados em agitação constante dentro de uma incubadora shaker modelo NT 715 (Novatecnica) a uma temperatura de 37°C. Após os intervalos de tempo de 2,4,6,24,48,72 e 96 horas foi retirada uma alíquota de 0,5 mL do meio. Finalmente, a alíquota retirada de cada amostra foi submetida ao método colorimétrico descrito no item 5.2.7. Este ensaio foi realizado em triplicata.

É importante constatar que, para que o volume do meio de liberação permanecesse constante ao longo do teste, a cada vez que uma alíquota era retirada do meio de liberação de algum tubo falcon, era repostado logo em seguida com solução PBS recém-preparada; baseado

no método proposto por Yadav e Kandasubramanian (2013 apud PREMIKA; BALASUBRAMANIAN; KODAM, 2015).

5.2.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana das nanopartículas foi realizada através do método de difusão em disco, com base nos procedimentos propostos por Hudzicki (2009).

Para cada cepa de bactérias (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 8739), foram realizados dois ensaios: um com as amostras puras (PLA:QUI 1, PLA:QUI 2 e PLA:QUI 3) e outro com as amostras incorporadas (PLA:QUI 1 + PROP, PLA:QUI 2 + PROP e PLA:QUI 3 + PROP). Sendo que, em ambos os casos, 4 mg de nanopartículas foram suspensas em 1 mL água destilada.

Para cada ensaio, foram usados 5 discos estéreis de 6 mm; 3 desses discos receberam uma alíquota de 20 µL da suspensão das respectivas nanopartículas, 1 disco recebeu o controle positivo (digluconato de clorexidina) e 1 disco recebeu o controle negativo (água destilada).

Em cada ensaio, uma placa de petri contendo ágar Mueller-Hinton (MH) foi inoculada com a bactéria. Os 5 discos que receberam previamente as amostras, foram depositados sobre o ágar inoculado.

As placas permaneceram por 15 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, foram incubadas a 37°C por 24 horas. A medição dos halos de inibição foi realizada utilizando um paquímetro analógico da marca Mitutoyo.

5.2.10 Concentração mínima inibitória (CMI)

A avaliação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) é definida como a menor concentração de uma substância capaz de inibir o crescimento de um microorganismo (GARDELLI, 2018). A determinação da CMI foi realizada através do método de microdiluição, no qual são utilizadas microplacas de 96 poços.

Foram realizados dois ensaios, um para análise de CMI frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e outro frente a *Escherichia coli* ATCC 8739. Nos ensaios, o primeiro poço de cada amostra tinha uma concentração de 10 mg/mL, sendo que nos poços seguintes, as concentrações foram obtidas por diluições sucessivas.

Em cada poço, foi adicionada uma alíquota de 100 µL de sua respectiva amostra e 100 µL da bactéria inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI). Em cada ensaio, os controles foram adicionados na última linha de amostras. Após o preenchimento de todos os poços, cada amostra foi incubada a 37°C durante 24 horas.

Após o período de incubação, foi realizado o método colorimétrico com resazurina sódica 0,01%. Para o método, cada poço recebeu uma alíquota de 20 µL e a leitura visual dos resultados foi realizada após 90 minutos. A coloração azul do poço indica inatividade bacteriana e a coloração rosa indica atividade bacteriana.

5.3 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.3.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Espalhamento dinâmico de luz é um método eficiente para determinar o tamanho médio e a distribuição de tamanhos de partículas em suspensão. No método, o equipamento emite uma radiação monocromática sobre as partículas e realiza a leitura dos ângulos de espalhamento esboçados por elas em diferentes momentos. As partículas, por sua vez, estão constantemente realizando Movimento Browniano (movimento aleatório realizado por partículas em suspensão), sendo assim, suas posições flutuam. Correlacionando os ângulos de espalhamento exibidos pelas partículas em diferentes posições, o computador do equipamento realiza os cálculos necessários, determinando assim, o diâmetro hidrodinâmico das partículas suspensas. Na tabela 2 estão apresentados os tamanhos médios e índices de polidispersividade (PDI) das NPs puras e das incorporadas.

Tabela 2 - Resultados de DLS das nanopartículas

Amostras	Diâmetro médio (nm)	PDI
PLA:QUI 1	181,9	0,532
PLA:QUI 1 + PROP	268,5	0,493
PLA:QUI 2	272,2	0,388
PLA:QUI 2 + PROP	287,3	0,774
PLA:QUI 3	509,1	0,827
PLA:QUI 3 + PROP	885,4	0,964

*pH = 4,0

Fonte: Do autor.

As amostras com os menores tamanhos de partículas foram aquelas com a menor quantidade de quitosana: PLA:QUI 1 e PLA:QUI 1 + PROP. Dentre todas as amostras, a que apresenta uma distribuição de tamanhos de partículas mais homogênea é a PLA:QUI 2, que apresenta o índice de polidispersão (PDI) equivalente a 0,388.

Na tabela 2, comparando-se os resultados das nanopartículas puras, observa-se que o diâmetro médio aumenta de acordo com a quantidade de quitosana presente na amostra. Observa-se também que a incorporação da própolis aumenta abruptamente os tamanhos das partículas, exceto pela amostra PLA:QUI 2 + PROP, cujo diâmetro médio aumentou somente 15,1 nm em comparação à amostra pura. Esse resultado, é um indicativo de que a própolis foi incorporada com sucesso nas nanopartículas.

Yuan et al. (2008) sintetizou NPs de quitosana/PLA incorporadas com rapamicina para imunossupressão no transplante de córnea, também através do método de nanoprecipitação (com algumas diferenças nas etapas); é importante observar que a quitosana utilizada nessa síntese foi modificada com colesterol para estabilizar as nanopartículas. O tamanho de partículas obtido foi de aproximadamente 300 nm, resultado semelhante ao obtido com a amostra PLA:QUI 2 + PROP. Yuan et al. (2008) realizou testes *in vivo*, os resultados obtidos evidenciaram que suas nanopartículas apresentaram um excelente efeito de imunossupressão. Sendo assim, tamanhos de partículas de aproximadamente 300 nm apresentam potencial para utilização em transplantes de córnea.

No estudo realizado por Golub et al. (2010) foram sintetizadas nanopartículas de Poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) carregadas com fator de crescimento endotelial vascular (VEGF – Vascular endotelial growth factor) com diâmetro médio de aproximadamente 400 nm para promover o crescimento vascular. Para testar a eficácia das nanopartículas foi utilizado um modelo de ligação de artéria femoral de camundongo e o resultado obtido foi positivo. Na tabela 3 são apresentados diferentes tipos de nanopartículas poliméricas e suas respectivas aplicações em potencial.

Tabela 3 – Tamanhos médios e potenciais de aplicação para diferentes tipos de nanopartículas

Composição das nanopartículas	Encapsulado	Tamanho médio de partículas	Potencial de aplicação	Referência
Quitosana/PLA	Rapamicina	219 – 326 nm	Imunossupressão em transplante de córnea	(YUAN et al., 2008)
Quitosana/PLA	Antraquinona	100 - 200 nm	Potencial anticâncer	(JEEVITHA; AMARNATH, 2013)
Quitosana/PLA	Fluorouracil	124 - 274 nm	Administração ocular no tratamento de carcinoma da conjuntiva / de células escamosas	(NAGARWAL et al., 2010)
Quitosana	Própolis	126 – 512 nm	Analisaram as propriedades antimicrobiana e antibiofilme das nanopartículas contra <i>Enterococcus faecalis</i> .	(ONG et al., 2017)
PLGA	VEGF	≅ 400 nm	Promoção do crescimento vascular	(GOLUB et al., 2010)
PLGA	Insulina	≅ 400 nm	Administração via pulmonar de insulina	(KAWASHIMA et al., 1999)

Fonte: Do autor.

Em estudos realizados por Nagarwal et al. (2010), foram sintetizadas também nanopartículas de PLA revestidas com quitosana para administração oftálmica de fármacos, os tamanhos de partículas obtidos no presente trabalho variaram entre 124 e 274 nm. Adicionalmente, os tamanhos de partículas foram similares aos observados na tabela 2, exceto pelas amostras PLA:QUI 3 e PLA:QUI 3 + PROP, que foram as amostras com os maiores tamanhos de partículas.

Haley e Frenkel (2008) realizaram um estudo sobre o potencial de nanopartículas no tratamento de câncer. De acordo com este, o tamanho das lacunas entre as células endoteliais varia entre 100 e 750 nm dependendo do tumor. Sendo assim, considera-se que as amostras observadas na tabela 2, cujo tamanho encontra-se dentro dessa faixa, apresentam um maior potencial para o tratamento de células tumorais.

De acordo com Sung, Pulliam e Edwards (2007), o epitélio pulmonar é espesso (50 a 60 µm) na traqueia, representando assim, uma barreira à passagem de partículas maiores. No estudo realizado por Kawashima et al. (1999) foram sintetizadas nanopartículas de

aproximadamente 400 nm para administração de insulina no pulmão e realizados testes in vivo, obtendo assim, resultados positivos.

Portanto, considera-se que as partículas com diâmetro inferior a 400 nm exibidas na tabela 2 também apresentam um grande potencial para administração no tecido pulmonar e para possível utilização em crescimento vascular.

5.3.2 Potencial zeta em função do pH

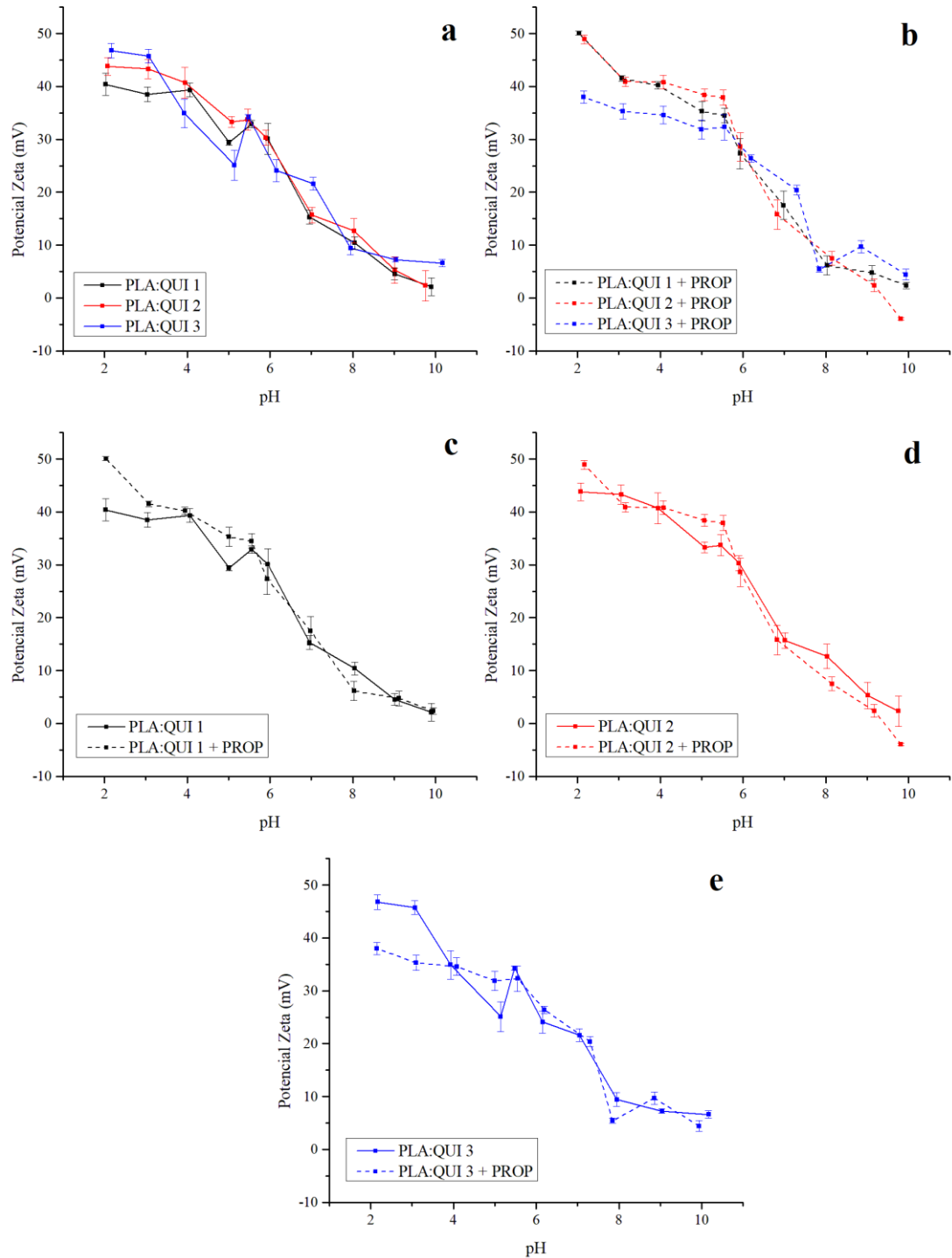
O potencial zeta é uma medida da carga da partícula, assim sendo, quanto maior for o seu valor absoluto maior será o valor da carga na superfície. De certa forma, a medição do potencial zeta de uma partícula representa um índice que representa a sua estabilidade. No caso de partículas carregadas, conforme o potencial zeta cresce, as interações repulsivas entre as partículas serão maiores, sendo assim, as interações repulsivas entre as partículas serão maiores, levando à formação de partículas mais estáveis e com uma distribuição de tamanhos mais uniforme. Para que uma nanosuspensão seja considerada estável, o valor do potencial zeta da mesma deve ser inferior a -30 mV ou superior a +30mV (HANS; LOWMAN, 2002). Na tabela 4 são apresentados os valores de potencial zeta das amostras.

Na figura 8 são apresentados os valores de potencial zeta em função do pH para as nanopartículas, que mostra a variação da carga superficial das nanopartículas de acordo com o pH. Observa-se que as amostras apresentam uma grande quantidade de cargas positivas.

No estudo da estabilidade coloidal das nanopartículas puras (Figura 8a), as cargas positivas exibidas pelas nanopartículas podem ser atribuídas pelos grupos amino residuais provenientes da quitosana. Além disso, estes grupos são livremente acessíveis para possíveis interações com fármacos (BERTHOLD; CREMER; KREUTER, 1996).

No caso das nanopartículas incorporadas (figura 8b), as cargas permanecem majoritariamente positivas. Entretanto, a amostra PLA:QUI 2 + PROP exibe um potencial zeta de -3,95 mV no pH 9,82. Essa redução no potencial (observada próximo ao pH 10) das nanopartículas incorporadas em relação às nanopartículas puras, pode ser atribuído aos componentes da própolis. Pois de acordo com Machado (2017), que avaliou o potencial zeta de nanopartículas de própolis, mudanças no ambiente (tais como o pH) podem causar a liberação de alguns compostos da própolis, o que poderia influenciar no potencial de repulsão das nanopartículas.

Figura 8 - Potencial zeta em função do pH



Fonte: Do autor.

Legenda: a) Nanopartículas puras.

b) Nanopartículas incorporadas.

c) Comparativo: PLA:QUI 1 e PLA:QUI 1 + PROP.

d) Comparativo: PLA:QUI 2 e PLA:QUI 2 + PROP.

e) Comparativo: PLA:QUI 3 e PLA:QUI 3 + PROP.

Observa-se que todas as amostras, entre os pHs 2 e 5,5, apresentaram potencial zeta superior a 30 mV, indicando assim que nesses pHs todas as amostras são estáveis e apresentam boa dispersão quando suspensas.

A adesão das nanopartículas à membrana celular é muito afetada pela carga superficial das partículas. As superfícies celulares são dominadas por proteoglicanos sulfatados negativamente carregados que desempenham papéis fundamentais na proliferação, migração e motilidade celular (HONARY; ZAHIR, 2013). Sendo assim, as amostras se mostram adequadas para adesão celular, visto que por serem positivas irão aderir às superfícies celulares que, por sua vez, são carregadas negativamente.

Analisando os gráficos (c), (d) e (e) da figura 8, pode-se comparar o comportamento das nanopartículas puras com as nanopartículas incorporadas. As maiores variações de carga superficial são observadas, aproximadamente, no pH 2. Nesse pH, as amostras PLA:QUI 1 e 2 apresentam uma maior carga para as nanopartículas incorporadas em relação às nanopartículas puras, apresentando assim uma maior estabilidade.

As cargas positivas apresentadas pelas nanopartículas podem contribuir positivamente em aplicações como sistemas de administração de fármaco através da pele. Visto que compostos catiônicos podem ter um efeito positivo em permeação de pele, uma vez que a pele carrega uma carga superficial negativa devido à fosfatidilcolina e carboidratos encontrados em células de mamíferos (HONARY; ZAHIR, 2013).

Além disso, valores positivos de potencial zeta implicam em outras aplicações interessantes. O potencial zeta positivo é importante para a administração de fármacos por via ocular uma vez que este fator facilita a adesão efetiva à superfície epitelial da córnea, prolongando a liberação de fármaco e melhorando a biodisponibilidade do fármaco no tecido interno do olho devido à interação entre as cargas positivas e negativas. Além disso, valores positivos de potencial zeta também possibilitam aplicação em sistemas mucoadesivos de administração de fármacos, pois dão origem a fortes interações eletrostáticas com a superfície negativamente carregada da mucosa (HONARY; ZAHIR, 2013).

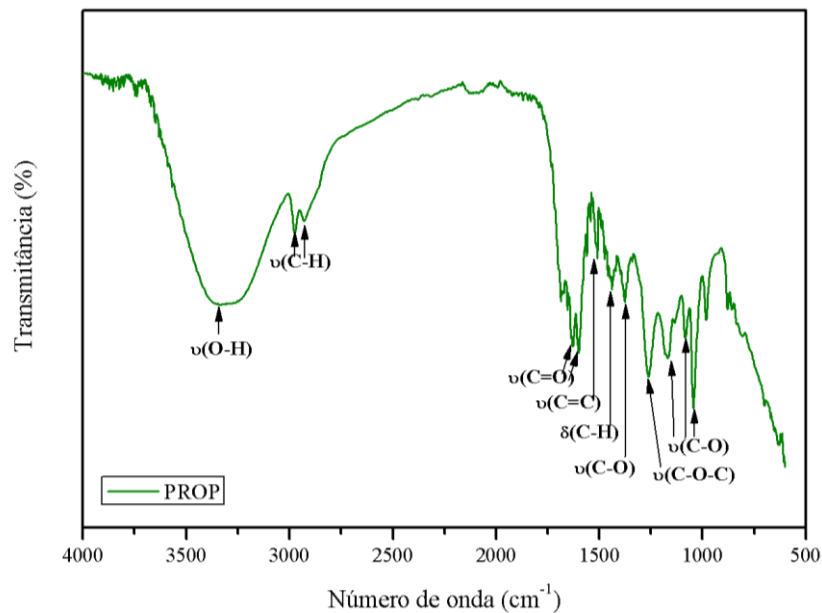
5.3.3 FTIR

Inicialmente, a própolis foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). Através dessa técnica é possível a obtenção de informações de compostos orgânicos, a nível molecular e de forma qualitativa, permitindo identificar grupos funcionais em uma amostra.

O espectro de FTIR da própolis apresenta uma banda em 3317 cm^{-1} (grupo hidroxilfenólico), o que evidenciou um estiramento O-H, típico de compostos fenólicos. As bandas em 2974 e 2929 cm^{-1} são características do estiramento C-H para aromáticos e a banda em 1046 cm^{-1} é atribuída ao estiramento da ligação C-O de éter aromático (para flavonoides) (NASCIMENTO et al., 2016; SCATOLINI, 2017; SILVERSTEIN, 2005; HOLLAS, 2004).

O espectro também apresentou bandas de absorção características em 1509 e 1377 , as quais estão associadas a vibrações de estiramento (em anéis aromáticos) para C=C e C-O, respectivamente. A banda em 1262 cm^{-1} representa uma vibração de estiramento C-O-C de polióis em anel aromático (PATIL et al., 2015; SILVERSTEIN, 2005). Na figura 9, é possível visualizar o espectro de FTIR da própolis.

Figura 9 - Espectro FTIR da própolis



Fonte: Do autor.

As bandas em 1629 e 1601 cm^{-1} no espectro da própolis são atribuídas à presença de vibração de estiramento C=O. A banda em 1439 cm^{-1} pode ser relacionada ao CH_3 , CH_2 e CH de flavonoides e anéis aromáticos. Há uma banda em 1085 cm^{-1} que representa o estiramento C-O de grupos éster e uma banda em 1168 cm^{-1} que indica uma vibração de estiramento C-O em um álcool terciário (OLIVEIRA, R. N. et al., 2016a; OLIVEIRA, R. N. et al., 2016b; SHARAF; HIGAZY; HEBEISH, 2013; SILVERSTEIN, 2005).

Observa-se no espectro FTIR da própolis a presença de flavonoides, pois o espectro apresenta as bandas características dos grupos C-O-C, o que indica a presença desse composto

na amostra. Foi possível identificar também a presença de bandas características, que evidenciam vibrações em O-H e C=C, referentes aos grupos funcionais para fenóis e anéis aromáticos, respectivamente. Identificar a presença de fenóis e flavonoides foi um resultado interessante, visto que eles estão relacionados com a atividade antimicrobiana da própolis. A tabela 4 mostra as atribuições para as principais bandas de absorção presentes na própolis.

Tabela 4 - Bandas FTIR presentes na própolis

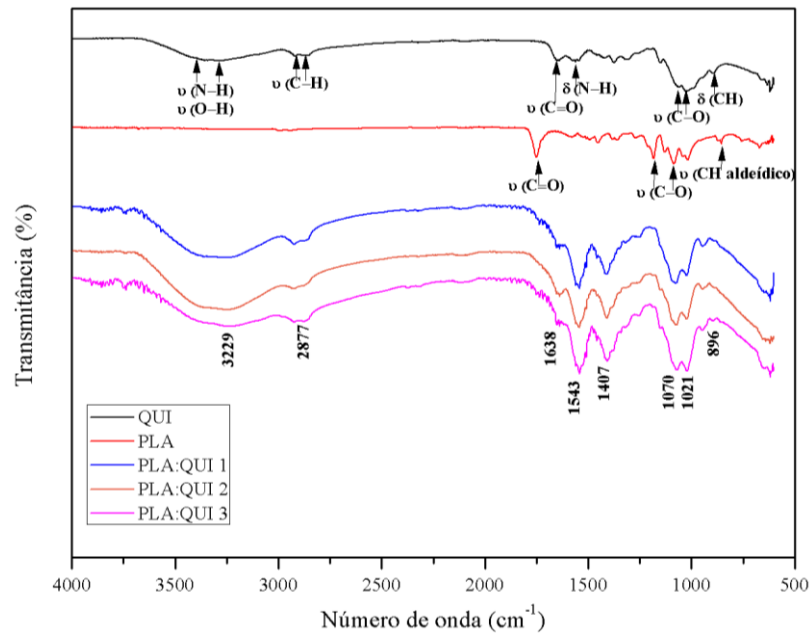
Própolis (cm⁻¹)	Modos vibracionais dos grupos da própolis
3317	Estiramento (O-H) ligado a compostos fenólicos
2974	Estiramento (C-H) em aromáticos
2929	Estiramento (C-H) em aromáticos
1629	Estiramento (C=O)
1601	Estiramento (C=O)
1509	Estiramento (C=C) de ésteres e éteres em aromáticos
1439	Dobramento (C-H)
1377	Estiramento (C-O)
1262	Estiramento (C-O-C) de polióis em aromáticos
1168	Estiramento (C-O) em um álcool terciário
1085	Estiramento (C-O) de grupos éster
1046	Estiramento (C-O) de éter aromático (em flavonoides)

Fonte: Do autor.

Os espectros de FTIR da quitosana, do PLA e das amostras de nanopartículas PLA:QUI são apresentados na figura 10.

A atribuição das bandas da quitosana foi a seguinte (cm⁻¹): 3356 - 3287 (estiramento de O-H em sobreposição com o estiramento de N-H), 2873 (estiramento de C-H), 1655 (banda de amida I, estiramento C=O do grupo acetila), 1562 (dobramento de N-H das ligações de amida), 1060-1027 (estiramento C-O) e 896 (estiramento C-H). A atribuição das bandas do PLA foi a seguinte (cm⁻¹): 1752 (estiramento C=O), 1183 e 1085 (estiramento C-O) e 855 (estiramento C-H de aldeído) (LI et al., 2012; JEEVITHA; AMARNATH, 2013; SILVERSTEIN, 2005; STUART, 2004). Observa-se na figura 10, que os espectros das nanopartículas apresentam bandas características de ambos os constituintes (quitosana e PLA), sugerindo que o PLA foi revestido pela quitosana com sucesso nas nanopartículas (WANG et al., 2015).

Figura 10 - Espectros FTIR: Quitosana, PLA e nanopartículas



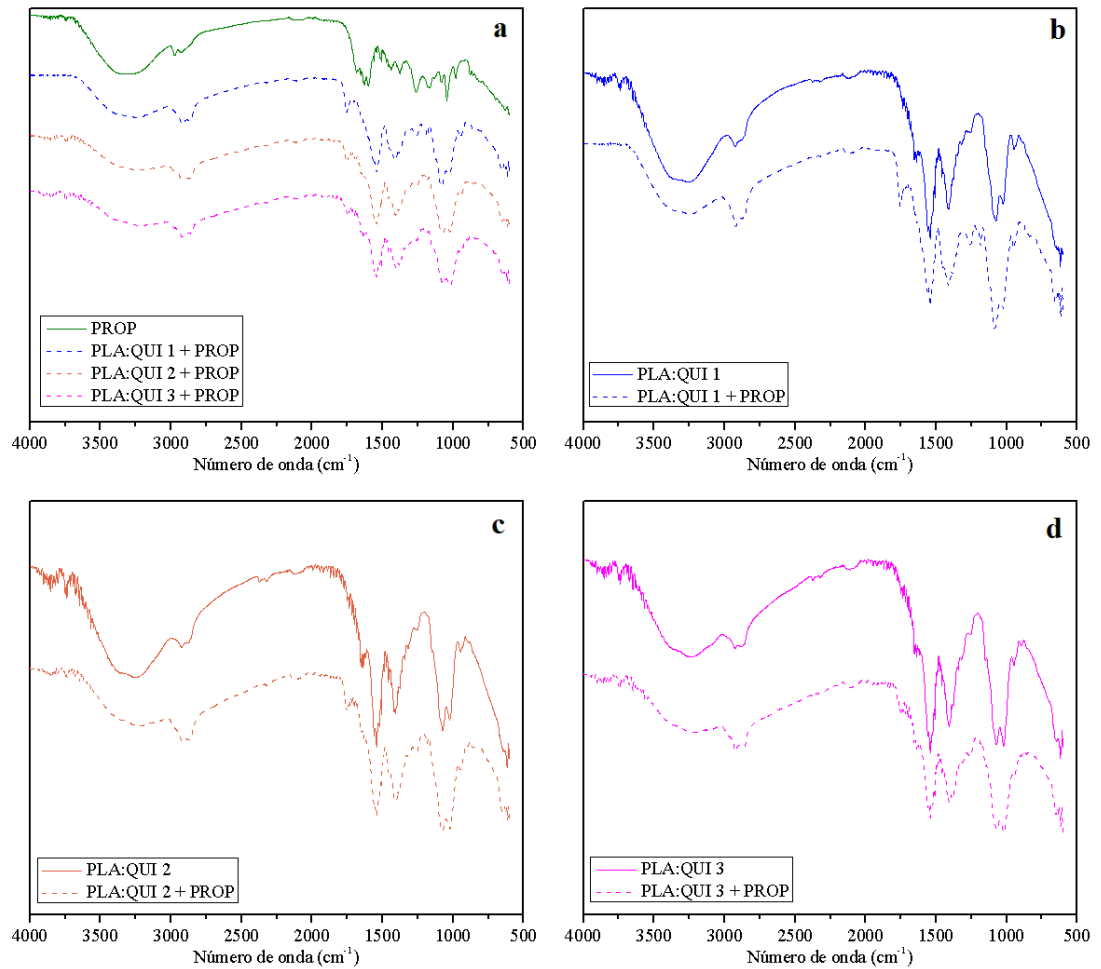
Fonte: Do autor.

Na figura 11a, pode-se observar uma comparação entre os espectros das nanopartículas incorporadas e o espectro da própolis. Houve mudanças importantes nas bandas observadas em 1752-1638 cm^{-1} , e em outras regiões houve sobreposição de bandas características da quitosana e PLA com bandas dos constituintes da própolis.

Os espectros comparativos entre as nanopartículas puras e as nanopartículas incorporadas são apresentados nos itens (b), (c) e (d) da figura 11 e a tabela 5 mostra as atribuições para as principais bandas de absorção presentes nas nanopartículas.

Observa-se que as bandas em 2922-2856 cm^{-1} ficam mais intensas nas amostras incorporadas, provavelmente devido às vibrações de estiramento da ligação C-H nos grupos CH_2 e CH_3 , respectivamente (SHEN; KAMDEM, 2015). Em comparação com as nanopartículas puras, houve um deslocamento na banda em 1752 cm^{-1} associada ao estiramento C=O dentro do grupo carboxílico (Tabela 6). Observa-se também que há uma mudança na banda em 1638 cm^{-1} (que já havia sido identificado nas nanopartículas puras), trata-se de um aumento da intensidade que ocorre progressivamente conforme aumenta a quantidade de quitosana presente na amostra. Essa banda está relacionada ao estiramento C=C dentro do anel aromático. Essas mudanças indicam que os grupos funcionais de compostos fenólicos presentes na própolis foram incorporados nas nanopartículas (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016).

Figura 11 - Espectros FTIR



Fonte: Do autor.

Legenda: a) Própolis e nanopartículas incorporadas.

b) PLA:QUI 1 + PROP.

c) PLA:QUI 2 + PROP.

d) PLA:QUI 3 + PROP.

Tabela 5 - Bandas FTIR presentes nas nanopartículas

(continua)

NPs puras (cm ⁻¹)	NPs incorporadas (cm ⁻¹)	Modos vibracionais dos grupos das NPs
3229	3214	Estiramento das ligações O-H e N-H
-	2922	Estiramento da ligação C-H em grupos -CH ₂
2877	2856	Estiramento da ligação C-H em grupos -CH ₃
1738	1752	Estiramento C=O dentro do grupo carboxílico
1638	1638	Estiramento C=C
1543	1543	Dobramento N-H (Amida II)
1407	1406	Dobramento OH
1256	1262	Estiramento C-O-H

Tabela 5 - Bandas FTIR presentes nas nanopartículas

		(conclusão)
NPs puras (cm⁻¹)	NPs incorporadas (cm⁻¹)	Modos vibracionais dos grupos das NPs
1070	1070	Estiramento (CO) do anel (C-O-H), (C-O-C) e CH ₂ CO
1021	1021	Estiramento (C-O)

Referências: (FRANCA et al., 2014); (SIRIPATRAWAN; VITCHAYAKITTI, 2016); (MATEI et al., 2015); (SUTJARITTANGTHAM et al., 2014).

Fonte: Do autor.

5.3.4 MEV

As imagens de MEV são apresentadas na figura 12, e observa-se que as nanopartículas foram formadas com sucesso. A forma das nanopartículas é aproximadamente esférica, principalmente nas amostras PLA:QUI 1 e PLA:QUI 2, tanto puras quanto incorporadas com própolis. Já as amostras PLA:QUI 3 (puras e incorporadas) exibiram uma forma mais irregular que as demais.

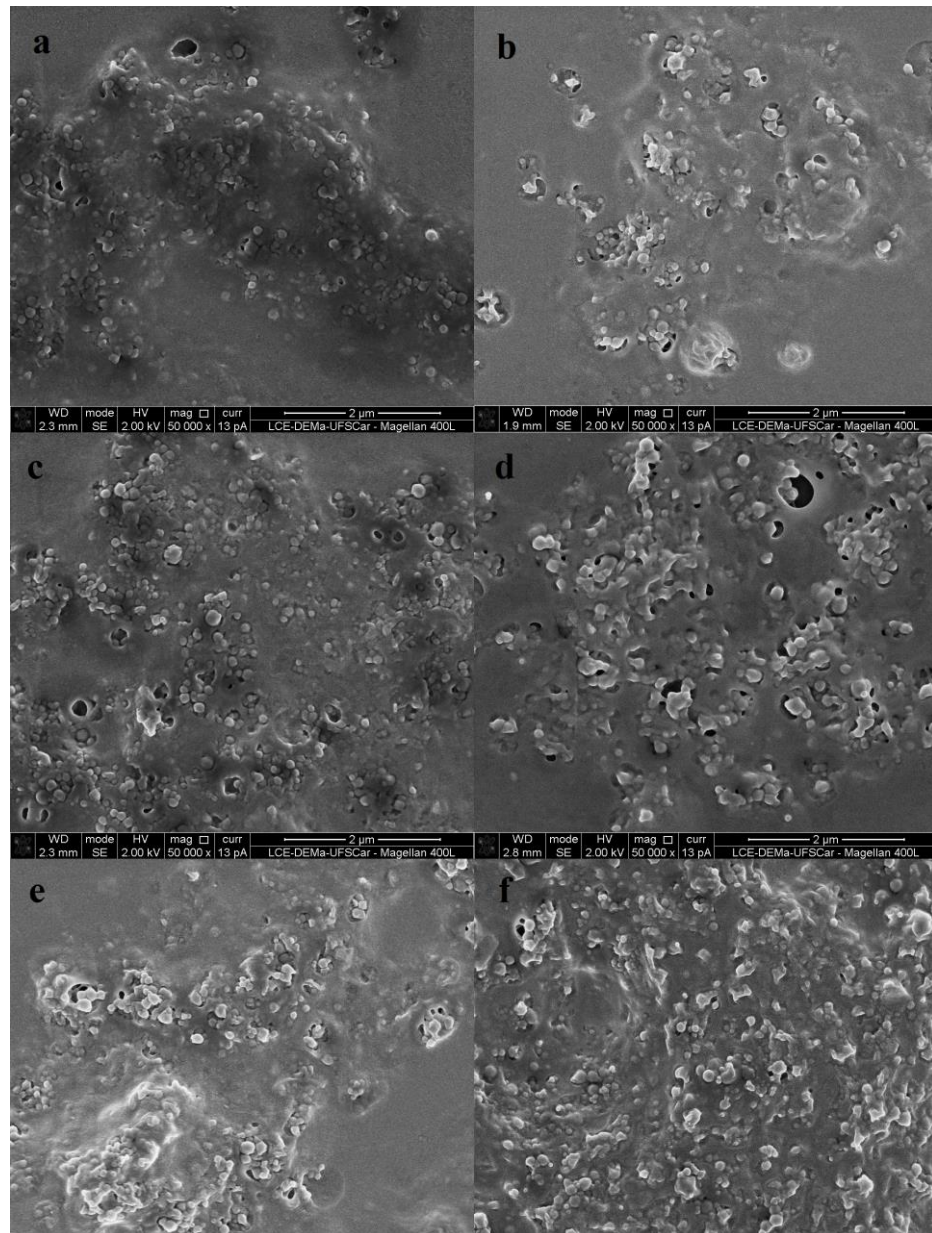
O tamanho das nanopartículas é importante pois está diretamente relacionado à estabilidade, adesão celular, biodistribuição e liberação dos fármacos em nanomedicina (JEEVITHA; AMARNATH, 2013). De acordo com Singer, Barakat e Mohapatra (2019), nanopartículas mais uniformes tendem a fluir com mais facilidade do que partículas irregulares. Adicionalmente, essa forma observada nas nanopartículas é altamente importante tanto para o transporte das nanopartículas no organismo quanto para a adesão celular. Sendo assim, as amostras PLA:QUI 1 e PLA:QUI 2, tanto puras quanto incorporadas, apresentam um melhor potencial para aplicações biomédicas, visto que apresentam menor tamanho de partículas e forma mais esférica, se comparadas as amostras PLA:QUI 3 e PLA:QUI 3 + PROP.

A estrutura das nanopartículas de quitosana/PLA observada no MEV mostrou uma morfologia fundida com forma irregular, na qual as nanopartículas se aglomeraram de modo a formarem nanoblendas. Esse efeito foi atribuído às diferentes condutividades iônicas das soluções de quitosana e PLA (JEEVITHA; AMARNATH, 2013).

Os tamanhos de partículas obtidos através do MEV variaram entre 203 e 498 nm para as nanopartículas puras e entre 254 e 861 nm para as nanopartículas incorporadas. Observa-se que estes resultados estão muito próximos aos valores de tamanho médio de partícula que foram obtidos por DLS. A amostra PLA:QUI 3 apresentou a formação de alguns

aglomerados, esse fenômeno também foi observado na amostra PLA:QUI 3 + PROP, porém, com menor intensidade. Observou-se também que as nanopartículas incorporadas são ligeiramente maiores que as nanopartículas puras, ratificando os dados de tamanho de partículas obtidos através de DLS (Tabela 2).

Figura 12 - MEV



Fonte: Do autor.

Legenda: a) PLA:QUI 1.

b) PLA:QUI 1 + PROP.

c) PLA:QUI 2.

d) PLA:QUI 2 + PROP.

e) PLA:QUI 3.

f) PLA:QUI 3 + PROP.

5.3.5 Quantidade de flavonoides totais da própolis

A quantidade de flavonoides totais da própolis utilizada para incorporar as nanopartículas é de 39,3 mg de quercetina/g de própolis. Quantidades similares foram obtidas por Righi et al. (2011) e por Andrade et al. (2017), que observaram em amostras de própolis vermelha quantidades de flavonoides, respectivamente, de 32,91 e 31,48 mg de quercetina/g de própolis.

Variações na quantidade de flavonoides totais identificadas em diferentes amostras de própolis são atribuídas principalmente a diferenças entre as plantas presentes em cada região em que a coleta foi realizada pelas abelhas (AHN et al., 2007). Adicionalmente, foi sugerido que flavonoides e outros fenólicos desempenham um papel preventivo no desenvolvimento de câncer e outras doenças cardíacas (KÄHKÖNEN et al., 1999).

5.3.6 Avaliação da eficiência de encapsulamento

Na tabela 7 são apresentados os resultados das avaliações de eficiência de encapsulamento para as nanopartículas PLA/QUI (1-3), alcançando valores entre 76 e 89% para incorporação de propólis. Yuan et al. (2008) observou em suas amostras eficiências de encapsulamento entre 75,2 e 89,3%, ou seja, valores semelhantes aos obtidos neste trabalho. Em outro trabalho, Jeevitha e Amarnath (2013) obteve em suas nanopartículas valores de até 91,4%, similar ao observado para a amostra PLA:QUI 3 + PROP, que foi considerada a mais eficiente dentre as proporções de quitosana e PLA estudadas.

Tabela 6 - Eficiência de encapsulamento de própolis nas amostras

Amostras	Eficiência de encapsulamento (%)
PLA:QUI 1 + PROP	87,11 ± 2,41
PLA:QUI 2 + PROP	76,45 ± 5,04
PLA:QUI 3 + PROP	88,94 ± 3,57

Fonte: Do autor.

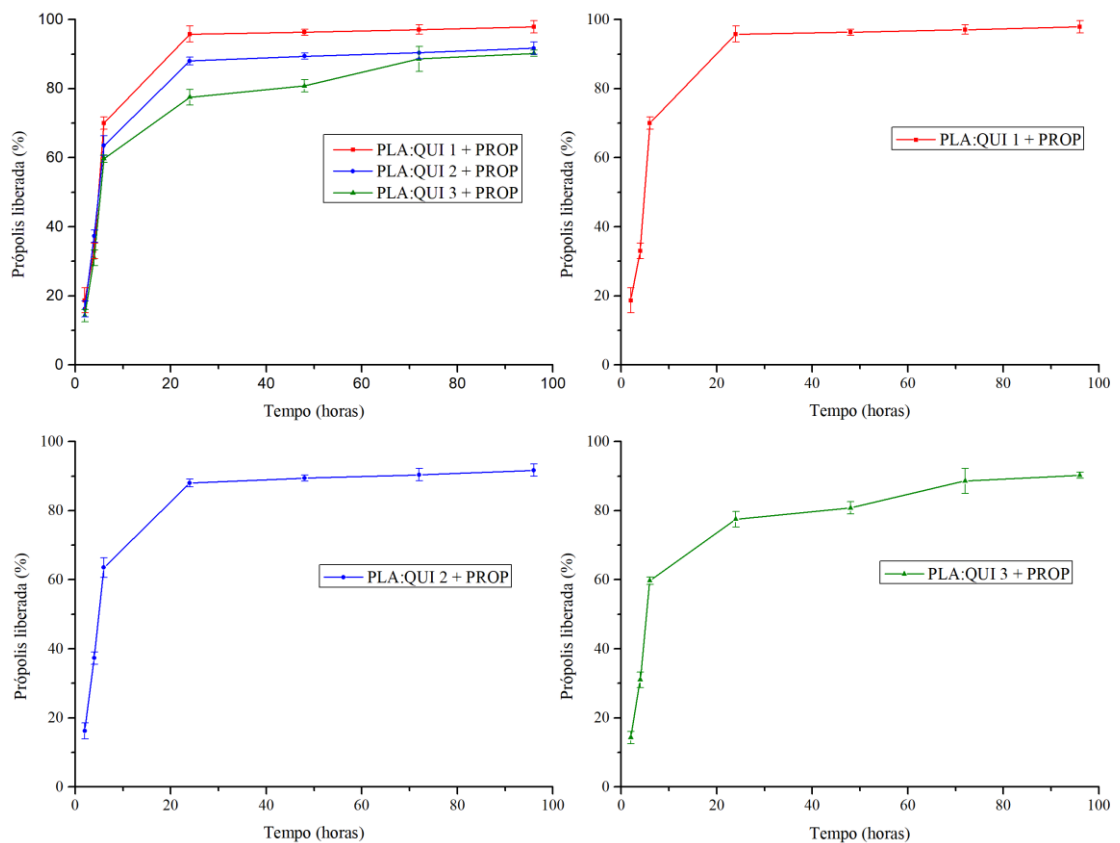
De todas as amostras, a que apresentou a eficiência de encapsulamento mais baixa foi a PLA:QUI 2 + PROP, cujo valor foi de 76,45%. Ainda assim, não pode ser considerado um valor baixo, pois no estudo realizado por Nagarwal et al. (2010) foram sintetizados diferentes

nanocarreadores de PLA e, de todos, o que apresentou a maior eficiência de encapsulamento exibiu o valor de 59,65%, que é um resultado menor ao que foi observado na nanopartícula PLA:QUI 2 + PROP.

5.3.7 Estudo de liberação *in vitro*

O perfil de liberação de própolis correspondente a cada amostra de nanopartículas incorporadas é apresentado pela figura 13. Observa-se que a nanopartícula que apresentou maiores valores de liberação foi a PLA:QUI 1 + PROP, apresentando uma concentração máxima de 62,13 $\mu\text{g/mL}$ após 24 horas. Enquanto a amostra que apresentou a menor liberação foi a PLA:QUI 3 + PROP, cujo valor máximo de concentração foi de 54,4 $\mu\text{g/mL}$ após 72 horas.

Figura 13 - Perfil de liberação de própolis



Fonte: Do autor.

Legenda: a) Nanopartículas incorporadas.

b) PLA:QUI 1 + PROP.

c) PLA:QUI 2 + PROP.

d) PLA:QUI 3 + PROP.

A taxa de dissolução é um fator essencial para a liberação de fármacos e também para a absorção dos mesmos pelo organismo. Por sua vez, a taxa de dissolução é influenciada pelo tamanho de partícula de tal modo que: quanto menor o tamanho de partícula, maior será a taxa de dissolução (SANDRI et al., 2014). Sendo assim, a melhor liberação apresentada pela amostra PLA:QUI 1 + PROP em relação às demais pode ser atribuída ao seu menor tamanho de partícula.

No estudo realizado por Jingou et al. (2011) foi realizado o estudo de liberação *in vitro* de nanopartículas de quitosana e ciclodextrina, comparando amostras incorporadas com metotrexato com outras amostras incorporadas com folinato de cálcio utilizando-se solução PBS de pH 7,4 como meio de liberação. Verificou-se nesse estudo que as amostras apresentaram duas fases de liberação, uma fase inicial com liberação acelerada e uma segunda fase de liberação que se inicia após 24 horas, na qual a liberação prossegue de forma mais lenta. Tal fenômeno foi também verificado nos perfis de liberação das nanopartículas da figura 11.

O efeito de liberação inicial acelerada pode ser visto em duas diferentes perspectivas: pode ser considerado um resultado negativo caso o objetivo seja a criação de dispositivos de liberação controlada a longo prazo, ou, em certas ocasiões, a liberação inicial acelerada pode ser desejada (HUANG; BRAZEL, 2001). Na tabela 7 são apresentados os efeitos favoráveis e negativos dessa liberação inicial acelerada.

Tabela 7 – Aplicações em que a liberação inicial acelerada pode ser favorável ou prejudicial

Situações favoráveis para a liberação acelerada	Efeitos negativos da liberação acelerada
Tratamento de feridas (liberação acelerada seguida por uma necessidade decrescente do fármaco)	Toxicidade local ou sistêmica (em caso de grandes concentrações de fármaco)
Sistemas de liberação direcionada	Necessidade de uma dosagem mais frequente
Sistemas de liberação pulsátil	Desperdício (econômico e terapêutico) do fármaco

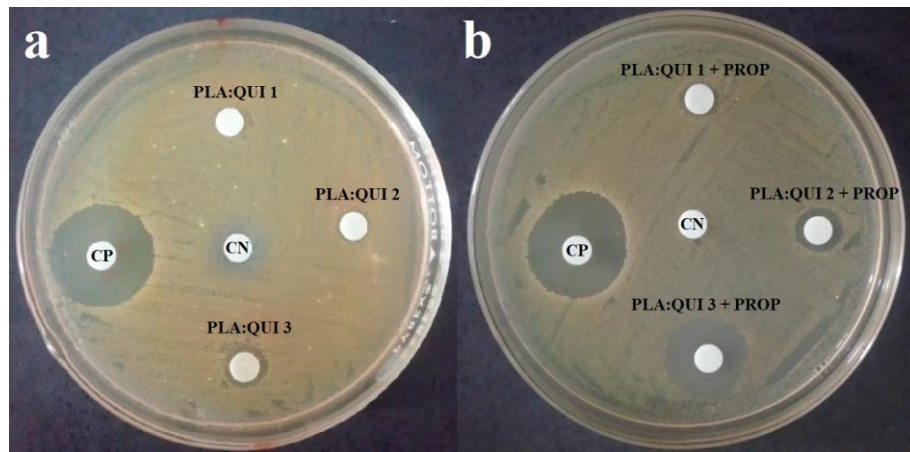
Fonte: Adaptado de Huang e Brazel (2001).

5.3.8 Avaliação da atividade antimicrobiana

Através do teste de difusão em ágar, foi avaliada, a atividade antimicrobiana das nanopartículas frente à uma cepa de bactérias gram-positiva (*Staphylococcus aureus*) e uma gram-negativa (*Escherichia coli*). Na figura 14 são apresentados os resultados do teste com *S. aureus*, enquanto na tabela 8 são apresentados os diâmetros dos halos de inibição referentes a cada amostra.

Observa-se que as amostras puras não se mostraram efetivas na inibição do crescimento da bactéria. Por outro lado, as nanopartículas incorporadas apresentaram um maior potencial antimicrobiano, sendo a nanopartícula PLA/QUI 3 +PROP a mais eficiente, apresentando um halo de inibição de 19 mm.

Figura 14 - Atividade antimicrobiana em placas inoculadas com *Staphylococcus aureus*



Fonte: Do autor.

Legenda: a) Nanopartículas puras.

b) Nanopartículas incorporadas.

* CP: Controle positivo; CN: Controle Negativo.

No trabalho realizado por Kartal et al. (2003) foi avaliada a atividade antimicrobiana de duas amostras de própolis, cada uma de uma região da Turquia. No estudo, o maior halo de inibição obtido foi de 11 mm. Este resultado foi semelhante ao observado na amostra PLA:QUI 2 + PROP (figura 14b), que apresentou um halo de inibição de 12 mm.

Shahverdi et al. (2007) sintetizou nanopartículas de prata carregadas com diferentes antibióticos para avaliar sua atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*. Nas nanopartículas incorporadas com Clindamicina, obtiveram uma zona de inibição de 9 mm, nas nanopartículas incorporadas com Benzilpenicilina, obtiveram uma zona de inibição de 12 mm e nas nanopartículas incorporadas com Amoxilina, obtiveram uma zona de inibição de 14

mm. Em comparação com essas nanopartículas, observa-se que a amostra PLA:QUI 3 + PROP apresenta uma maior atividade antimicrobiana frente à bactéria.

Tabela 8 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*

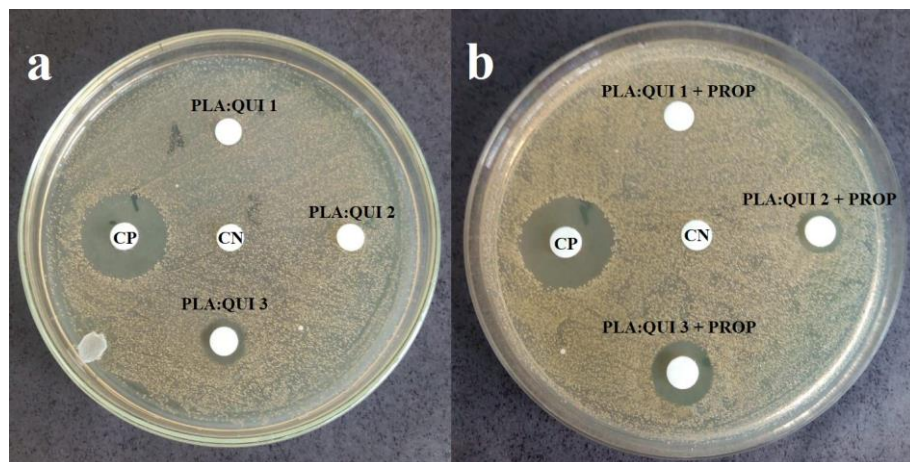
Amostras	Halo de inibição (mm)
PLA:QUI 1	-
PLA:QUI 2	-
PLA:QUI 3	10
PLA:QUI 1 + PROP	8,5
PLA:QUI 2 + PROP	12
PLA:QUI 3 + PROP	19
Controle positivo	22
Controle negativo	-

Fonte: Do autor.

Ainda em comparação com o estudo realizado por Shahverdi et al. (2007), observa-se que a amostra PLA:QUI 2 + PROP apresentou bons resultados se comparada às nanopartículas de prata incorporadas com Clindamicina, mas ainda assim, apresenta atividade antibacteriana equivalente às nanopartículas de prata incorporadas com Benzilpenicilina.

Na figura 15 são apresentados os resultados do teste com *E. coli*, enquanto na tabela 9 são apresentados os diâmetros dos halos de inibição referentes a cada amostra. Observa-se que, tanto para as nanopartículas puras quanto incorporadas, os halos de inibição foram menores, se comparados aos do teste com *S. aureus*.

Figura 15 - Atividade antimicrobiana em placas inoculadas com *Escherichia coli*



Fonte: Do autor.

Legenda: a) Nanopartículas puras.

b) Nanopartículas incorporadas.

* CP: Controle positivo; CN: Controle Negativo.

Azam et al. (2012) realizaram um estudo comparativo entre as atividades antibacterianas de nanopartículas de óxido de metal contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. No estudo, também foram utilizados como modelos *Staphylococcus Aureus* e *Escherichia coli*. Os resultados desse estudo também mostraram maior atividade antimicrobiana para as bactérias gram-positivas, em comparação às gram-negativas.

Tabela 9 - Avaliação da atividade antimicrobiana frente a *Escherichia coli*

Amostras	Halo de inibição (mm)
PLA:QUI 1	-
PLA:QUI 2	-
PLA:QUI 3	8
PLA:QUI 1 + PROP	-
PLA:QUI 2 + PROP	8
PLA:QUI 3 + PROP	12
Controle positivo	19
Controle negativo	-

Fonte: Do autor.

Divya et al. (2017) realizaram um estudo cujo objetivo foi sintetizar nanopartículas com diferentes concentrações de quitosana e avaliar a atividade antimicrobiana dessas diferentes amostras frente a diferentes bactérias. Os maiores halos de inibição frente a *E. coli* observados nesse estudo foram de 12 e 14 mm, evidenciando assim a atividade antimicrobiana da quitosana contra a bactéria. Vale constatar que estes halos foram semelhantes ao observado na amostra PLA:QUI 3 + PROP.

5.3.9 Concentração mínima inibitória (CMI)

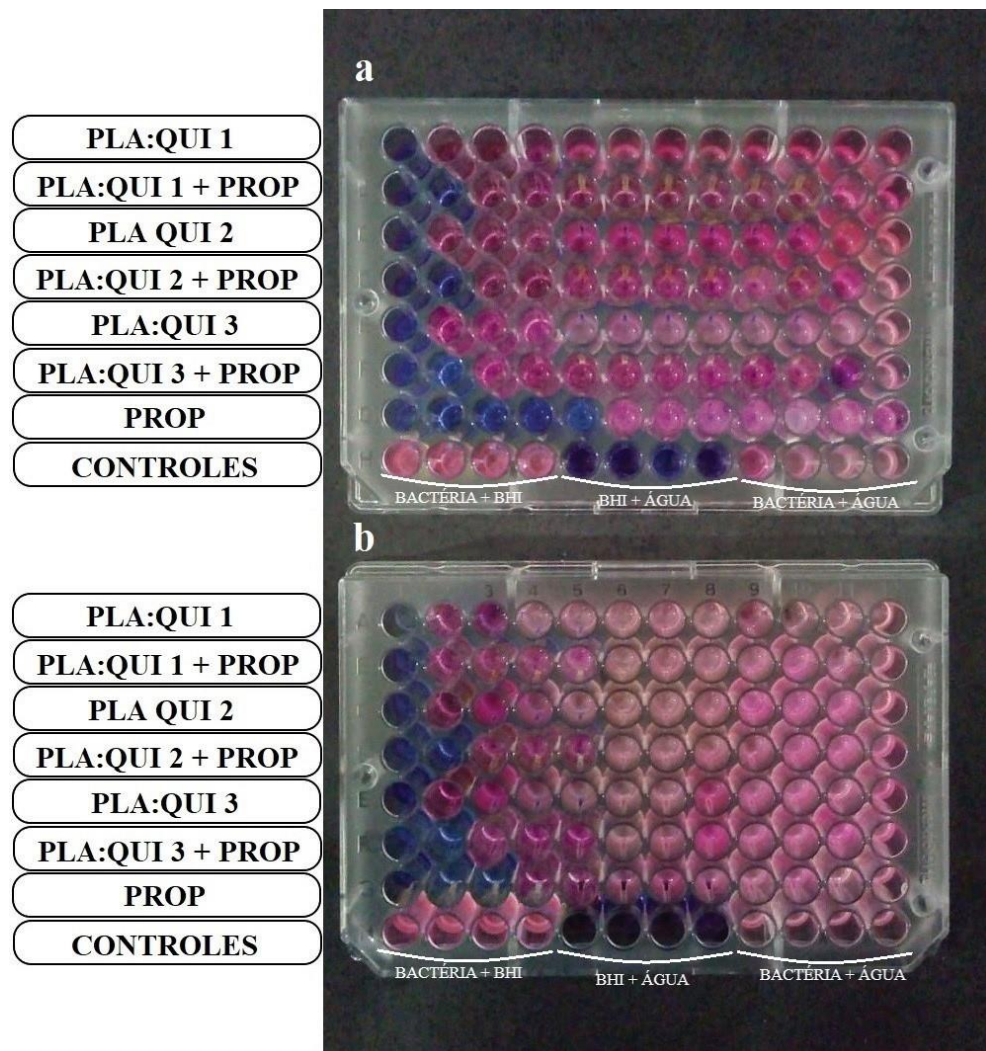
O *Staphylococcus aureus* é uma das causas mais comuns de infecções alimentares na maioria dos países. É uma bactéria anaeróbica gram-positiva que pode ser encontrada na narina, na pele e em outras partes externas do corpo humano. Algumas cepas de *S. aureus* são capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas e são os agentes causadores de infecção alimentar estafilocócica (BHATIA et al., 2007).

Apesar do fato de que a *Escherichia coli* seja uma bactéria comensal possa ser encontrada na microflora intestinal de uma variedade de animais incluindo o ser humano, nem

todas as cepas são inofensivas, podendo causar doenças debilitantes e, as vezes, fatais em humanos (JAFARI; ASLANI; BOUZARI, 2012).

A infecção microbiana e sua resistência a fármacos clinicamente aprovados são uma grande ameaça à saúde humana. Portanto, um dos métodos de maior eficácia para solucionar este problema é a Concentração mínima inibitória (CMI), que determina a menor concentração de um fármaco que inibe o crescimento visível de um organismo em teste (GUPTA; KUMAR, 2018). Na figura 16 são apresentados os resultados dos testes de CMI para as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Figura 16 - Concentração mínima inibitória



Fonte: Do autor.

Legenda: a) *Staphylococcus aureus*.

b) *Escherichia coli*.

Na figura 16, observa-se que a amostra que, conforme o esperado, a amostra que mostrou o maior potencial inibitório foi a própolis, com valores de concentração inibitória de 0,625 para *S. aureus* e 2,5 mg/mL para *E. coli*. Entre as nanopartículas, todas apresentaram CMI semelhante para ambas as bactérias. Para *S. aureus*, todas as nanopartículas incorporadas apresentaram CMI de 5 mg/mL. Para *E. coli*, as amostras PLA:QUI 2 + PROP e PLA:QUI 3 + PROP apresentaram CMI de 5 mg/mL, enquanto a amostra PLA:QUI 1 + PROP apresentou um potencial inibitório inferior, com CMI de 10 mg/mL. Na tabela 10 são apresentados os valores de CMI obtidos nas amostras da figura 14a.

Tabela 10 - Valores de CMI das amostras frente a *S. aureus*

Amostras	CMI (mg/mL)
PLA:QUI 1	10
PLA:QUI 1 + PROP	5
PLA:QUI 2	10
PLA:QUI 2 + PROP	5
PLA:QUI 3	10
PLA:QUI 3 + PROP	5
PROP	0,625

Fonte: Do autor.

No estudo realizado por Machado (2017), foi avaliada a CMI de diferentes nanopartículas de própolis com diferentes formulações frente a *S. aureus*. No estudo, foram observados valores de CMI de 310 µg/mL e 156 µg/mL, sendo que, a amostra que apresentou resultados de inibição que mais se aproximaram a estes, foi a de própolis (com 0,625 µg/mL); entretanto, as nanopartículas obtidas por Machado (2017) apresentaram uma capacidade inibitória consideravelmente maior.

Na tabela 11 são apresentados os valores de CMI obtidos nas amostras da figura 16b, observa-se que todas as amostras foram capazes de inibir a proliferação da bactéria. Em um estudo de Scatolini (2017) utilizando amostras de hidroxiapatita contendo diferentes tipos de própolis de origem brasileira verificou-se que a CMI das amostras frente à bactéria *E. coli*; indicou que entre todas as amostras, mesmo em diferentes concentrações, nenhuma foi capaz de inibir o crescimento bacteriano, demonstrando o grande potencial das nanopartículas produzidas com quitosana e PLA incorporadas com propólis, que atingiu CMI da ordem de até 5 mg/mL.

Tabela 11 - Valores de CMI das amostras frente a *E. coli*

Amostras	CMI (mg/mL)
PLA:QUI 1	10
PLA:QUI 1 + PROP	10
PLA:QUI 2	10
PLA:QUI 2 + PROP	5
PLA:QUI 3	10
PLA:QUI 3 + PROP	5
PROP	2,5

Fonte: Do autor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No desenvolvimento de nanopartículas para administração de fármacos, o tamanho médio da partícula é de fundamental importância para que estas sejam eficazes para determinadas aplicações no organismo. As nanopartículas PLA:QUI 1, PLA:QUI 1 + PROP, PLA:QUI 2 e PLA:QUI 2 + PROP apresentam um tamanho médio que lhes proporciona uma maior gama de possíveis aplicações, como por exemplo: transplante de córnea, tratamento de células tumorais, administração em tecido pulmonar e aplicação em crescimento vascular.

As nanopartículas formadas apresentaram cargas majoritariamente positivas em diferentes pH, esse resultado é interessante para a adesão celular, uma vez que superfícies celulares apresentam cargas negativas. Esse resultado indicou que as nanopartículas preparadas exibem potencial para administração em via ocular ou através da pele.

A espectroscopia na região do infravermelho foi importante para a determinação de compostos característicos presentes na própolis e para o estudo das ligações presentes nas nanopartículas. No espectro FTIR da própolis, foi possível verificar a presença de bandas características de flavonoides e de outros fenóis, compostos estes que são muito importantes para as atividades biológicas da própolis. No espectro FTIR das nanopartículas observou-se bandas características tanto do PLA quanto da quitosana.

O MEV das amostras de quitosana/PLA comprovou a formação de nanopartículas. Nas amostras PLA:QUI 1 e PLA:QUI 2, tanto puras quanto incorporadas, foi observada uma morfologia quase esférica, contendo algumas irregularidades. Nas amostras PLA:QUI 3, tanto puras quanto incorporadas, essa morfologia exibiu maiores irregularidades. Os resultados obtidos através da avaliação da eficiência de encapsulamento foram positivos, uma vez que os valores de eficiência de encapsulamento observados nas amostras foram todos maiores que 70%. A amostra que apresentou a melhor eficiência de encapsulamento foi a PLA:QUI 3 + PROP.

O estudo de liberação *in vitro* evidenciou um fenômeno de liberação inicial acelerada nas nanopartículas, sendo que este fenômeno ocorre durante as primeiras 24 horas. Esse fenômeno influencia diretamente na aplicabilidade das amostras, sendo que para aplicações como tratamento de feridas, o efeito é positivo; mas em outros casos pode gerar desperdícios.

As nanopartículas puras não exibiram grande potencial antimicrobiano frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. Já as nanopartículas incorporadas, exibiram um bom potencial antimicrobiano, principalmente frente a *S. aureus*. Vale constatar que a amostra que apresentou maior potencial de inibição nas avaliações antimicrobianas foi a PLA:QUI 3 +

PROP, que além de ser a amostra com maior concentração de quitosana, é a que apresentou melhor eficiência de encapsulamento.

O melhor valor de CMI para as nanopartículas foi de 5 mg/mL para *S. aureus* e *E. coli*. Esse teste mostrou que, dependendo da concentração, as amostras são eficazes até mesmo frente a bactérias gram-negativas (*E. coli*).

Os resultados sugerem que nanopartículas de quitosana/PLA contendo própolis são sistemas carreadores promissores para aplicações biomédicas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Testes in vivo;
- Avaliar atividade antimicrobiana frente a outras bactérias;
- Testar nanopartículas com diferentes formulações própolis.

REFERÊNCIAS

- AHSAN, Saad M. et al. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 110, p.97-109, abr. 2018.
- A KUJUMGIEV, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 64, n. 3, p.235-240, mar. 1999.
- ALUANI, Denitsa et al. Evaluation of biocompatibility and antioxidant efficiency of chitosan-alginate nanoparticles loaded with quercetin. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 103, p.771-782, out. 2017.
- ANDRADE, Julianna Karla Santana et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, [s.l.], v. 101, p.129-138, nov. 2017.
- ANDRADE, Julianna Karla Santana et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, [s.l.], v. 101, p.129-138, nov. 2017.
- AZAM, Ameer et al. Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. **International Journal Of Nanomedicine**, [s.l.], p.6003-6009, dez. 2012.
- BAG, G. C.; DEVI, P.; BHAIGYABATI, T.. Assessment of Total Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Methanolic Rhizome Extract of Three Hedychium Species of Manipur Valley. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research**. Imphal, p. 154-159. fev. 2015.
- BARBOSA, Maria Helena et al. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paulista de Enfermagem**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.318-322, jun. 2009.
- BERTHOLD, A.; CREMER, K.; KREUTER, J.. Preparation and characterization of chitosan microspheres as drug carrier for prednisolone sodium phosphate as model for anti-inflammatory drugs. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.17-25, mar. 1996.
- BERRETTA, Andresa A. et al. Functional Properties of Brazilian Propolis: From Chemical Composition Until the Market. In: WAISUNDARA, Viduranga; SHIOMI, Naofumi. **Superfood and Functional Food: An Overview of Their Processing and Utilization**. Londres: Intechopen, 2017. p. 55-73.
- BHATIA, Aruna et al. Staphylococcus Aureus Enterotoxins: A review. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**. Patiala, p. 188-197. jun. 2007.
- BOISSEAU, Patrick; LOUBATON, Bertrand. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. **Comptes Rendus Physique**, [s.l.], v. 12, n. 7, p.620-636, set. 2011.
- CASTRO, Karine Cappuccio de. **Síntese de nanopartículas de quitosana/PLA para liberação controlada de antibiótico no tratamento de mastite**. 2017. 65 f. Dissertação

(Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.

CHANG, Chia-chi et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal Of Food And Drug Analysis**. Neipu, p. 178-182. 16 maio 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test**; Approved Standard-Tenth Edition. Wayne, CLSI document M02-A10, 2009a.

DEMIR, Selim et al. Antiproliferative and proapoptotic activity of Turkish propolis on human lung cancer cell line. **Nutrition And Cancer**, [s.l.], v. 68, n. 1, p.165-172, 23 dez. 2015.

DEV, Ashish et al. Preparation of poly(lactic acid)/chitosan nanoparticles for anti-HIV drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, [s.l.], v. 80, n. 3, p.833-838, 5 maio 2010.

DIVYA, K. et al. Antimicrobial properties of chitosan nanoparticles: Mode of action and factors affecting activity. **Fibers And Polymers**, [s.l.], v. 18, n. 2, p.221-230, fev. 2017.

DRUMRIGHT, R. E.; GRUBER, P. R.; HENTON, D. E.. Polylactic Acid Technology. **Advanced Materials**, [s.l.], v. 12, n. 23, p.1841-1846, dez. 2000.

ELSABAHY, Mahmoud; WOOLEY, Karen L.. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.2545-2561, 2012. Royal Society of Chemistry (RSC).

FAHIM, I.s.; CHBIB, H.; MAHMOUD, Hamada Mohamed. The synthesis, production & economic feasibility of manufacturing PLA from agricultural waste. **Sustainable Chemistry And Pharmacy**, [s.l.], v. 12, p.1-5, jun. 2019.

FLYNN, Ted; WEI, Chiming. The pathway to commercialization for nanomedicine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.47-51, mar. 2005.

FRANCA, Juçara R et al. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-11, dez. 2014.

GARDELLI, Juliana F. de Carvalho. **Aplicações de Análise de Sobrevida em Dados de Concentração Inibitória Mínima**. 2018. 60 f. Dissertação (Mestrado em Bioestatística) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.

GARG, Tarun; RATH, Goutam; GOYAL, Amit K.. Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis. **Artificial Cells, Nanomedicine, And Biotechnology**, [s.l.], p.1-5, 14 fev. 2015.

GOLUB, Justin S. et al. Sustained VEGF delivery via PLGA nanoparticles promotes vascular growth. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 298, n. 6, p.1959-1965, jun. 2010.

GÓMEZ-RÍOS, David; BARRERA-ZAPATA, Rolando; RÍOS-ESTEPA, Rigoberto. Comparison of process technologies for chitosan production from shrimp shell waste: A techno-economic approach using Aspen Plus ®. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 103, p.49-57, maio 2017.

GUPTA, Meenakshi; KUMAR, Anoop. Comparison of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value of statin drugs: A Systematic Review. **Anti-infective Agents**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.4-19, 19 dez. 2018.

HADASHA, Waled; BEZUIDENHOUT, Deon. Poly(lactic acid) as Biomaterial for Cardiovascular Devices and Tissue Engineering Applications. **Industrial Applications Of Poly(lactic Acid)**, [s.l.], p.51-77, 2017.

HALEY, Barbara; FRENKEL, Eugene. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, [s.l.], v. 26, n. 1, p.57-64, jan. 2008.

HANS, M.I; LOWMAN, A.m. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. **Current Opinion In Solid State And Materials Science**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.319-327, ago. 2002.

HAWKING, Stephen. **O universo numa casca de noz**. Rio de Janeiro: Editora Intrínseca Ltda., 2001.

HOLLAS, J. Michael. Vibrational spectroscopy. In: HOLLAS, J. Michael. **Modern Spectroscopy**. 4. ed. Reading: John Wiley & Sons, 2004. Cap. 6. p. 137-198.

HONARY, S; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.255-264, 9 maio 2013.

HONARY, S; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal Of Pharmaceutical Research**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.265-273, 9 maio 2013.

HUANG, Shuai et al. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, [s.l.], v. 19, n. 12, p.19610-19632, 26 nov. 2014.

HUANG, Xiao; BRAZEL, Christopher S. On the importance and mechanisms of burst release in matrix-controlled drug delivery systems. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 73, n. 2-3, p.121-136, jun. 2001.

HUDZICKI, Jan. **Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol**. Washington, D.c: American Society For Microbiology, 2009.

JAFARI, Anis; ASLANI, Mohammad Mehdi; BOUZARI, Saeid. Escherichia coli: a brief review of diarrheagenic pathotypes and their role in diarrheal diseases in Iran. **Iranian Journal Of Microbiology**. Teerã, p. 102-117. set. 2012.

JEEVITHA, D.; AMARNATH, Kanchana. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 101, p.126-134, jan. 2013.

JINGOU, Ji et al. Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and in vitro release study. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 83, n. 1, p.103-107, mar. 2011.

JORGENSEN, James H.; TURNIDGE, John D.. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods. In: JORGENSEN, James H.; PFALLER, Michael A.; CARROLL, Karen C.. **Manual of Clinical Microbiology**. 7. ed. Washington, Dc: Asm Press, 2015. p. 1253-1273.

KABALA-DZIK, Agata et al. Comparison of Two Components of Propolis: Caffeic Acid (CA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest of Breast Cancer Cells MDA-MB-231. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1-15, 15 set. 2017.

KÄHKÖNEN, Marja P. et al. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 47, n. 10, p.3954-3962, out. 1999.

KARTAL, Murat et al. Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 86, n. 1, p.69-73, maio 2003.

KAWASHIMA, Y. et al. Pulmonary delivery of insulin with nebulized dl-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 62, n. 1-2, p.279-287, nov. 1999.

LASPRILLA, Astrid J.r. et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.321-328, jan. 2012.

LI, Jing et al. Preparation of biocompatible chitosan grafted poly(lactic acid) nanoparticles. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 51, n. 3, p.221-227, out. 2012.

LUZ, Camila Macedo da et al. Poly-lactic acid nanoparticles (PLA-NP) promote physiological modifications in lung epithelial cells and are internalized by clathrin-coated pits and lipid rafts. **Journal Of Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 15, n. 1, p.1-18, 31 jan. 2017.

MACHADO, Gabriela Tasso Bongiolo Pinheiro. **Desenvolvimento e avaliação *in vitro* das atividades antimicrobiana e citotóxica de nanopartículas de própolis para potencial uso intramamário**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

MACHADO, Gabriela Tasso Pinheiro et al. Development of propolis nanoparticles for the treatment of bovine mastitis: in vitro studies on antimicrobial and cytotoxic activities. **Canadian Journal Of Animal Science**, [s.l.], p.1-11, 25 abr. 2019.

MARÇO, Paulo Henrique; POPPI, Ronei Jesus; SCARMINIO, Ieda Spacino. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1218-1223, 2008.

MARCUCCI, M. C.. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.83-99, 1995.

MARTIN, Luiz Fernando Taranta et al. Topical Brazilian propolis improves corneal wound healing and inflammation in rats following alkali burns. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-7, 27 nov. 2013.

MATEI, Petruta Mihaela et al. Synthesis of Chitosan Oligomers/Propolis/Silver Nanoparticles Composite Systems and Study of Their Activity against *Diplodia seriata*. **International Journal Of Polymer Science**, [s.l.], v. 2015, p.1-11, 2015.

MCNAMARA, Karrina; TOFAIL, Syed A. M.. Nanoparticles in biomedical applications. **Advances In Physics: X**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.54-88, 23 nov. 2016.

MILADI, Karim et al. Nanoprecipitation Process: From Particle Preparation to In Vivo Applications. **Polymer Nanoparticles For Nanomedicines**, [s.l.], p.17-53, 2016.

MITRA, S et al. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran–doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. **Journal Of Controlled Release**, [s.l.], v. 74, n. 1-3, p.317-323, jul. 2001.

MORIGI, Valentina et al. Nanotechnology in Medicine: From Inception to Market Domination. **Journal Of Drug Delivery**, [s.l.], v. 2012, p.1-7, 2012.

NAGARWAL, Ramesh C. et al. Chitosan Coated PLA Nanoparticles for Ophthalmic Delivery: Characterization, In-Vitro and In-Vivo Study in Rabbit Eye. **Journal Of Biomedical Nanotechnology**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.648-657, 1 dez. 2010.

NAGAVARMA, B. V. N.; HEMANT, K. S. Yadav; AYAZ, A.. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles: A review. **Asian Journal Of Pharmaceutical And Clinical Research**, Mysore, v. 5, n. 3, p.16-23, jun. 2012.

NASCIMENTO, Ticiano Gomes do et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-16, 17 jun. 2016.

NGUYEN, Leanne Lai Tram. Nanomedicine: Economic Prospect and Public Safety. **Journal Of Developing Drugs**, [s.l.], v. 02, n. 03, p.1-2, 2013.

PREMIKA, G; BALASUBRAMANIAN, K; KODAM, Kisan M. Photo-bacterial Polycrylonitrile Matrix for Protective Apparels. In: THOMAS, Sabu et al. **Advanced Polymeric Materials: From Macro- to Nano-Length Scales**. Oakville: Apple Academic Press, 2015. Cap. 14. p. 227-236.

OLIVEIRA, Renata N. et al. FTIR analysis and quantification of phenols and flavonoids of five commercially available plants extracts used in wound healing. **Matéria (rio de Janeiro)**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.767-779, set. 2016a.

OLIVEIRA, Renata N. et al. Properties of PVA Hydrogel Wound-Care Dressings Containing UK Propolis. **Macromolecular Symposia**, [s.l.], v. 368, n. 1, p.122-127, out. 2016b.

ORYAN, Ahmad; ALEMZADEH, Esmat; MOSHIRI, Ali. Potential role of propolis in wound healing: Biological properties and therapeutic activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 98, p.469-483, fev. 2018.

ONG, Teik Hwa et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. **Plos One**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.1-22, 31 mar. 2017.

PATEL, Seema. Emerging Adjuvant Therapy for Cancer: Propolis and its Constituents. **Journal Of Dietary Supplements**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.245-268, 27 fev. 2015.

PATIL, Sharvil et al. Can green synthesized propolis loaded silver nanoparticulate gel enhance wound healing caused by burns? **European Journal Of Integrative Medicine**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.243-250, maio 2015.

PAWAR, Harshavardhan; DOUROUMIS, Dionysios; BOATENG, Joshua S.. Preparation and optimization of PMAA–chitosan–PEG nanoparticles for oral drug delivery. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, [s.l.], v. 90, p.102-108, fev. 2012.

PEREIRA, Alberto dos Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva; AQUINO NETO, Francisco Radler de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.321-326, maio 2002.

PRABAHARAN, M.. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 72, p.1313-1322, jan. 2015.

RAGELLE, Héloïse et al. Nanoparticle-based drug delivery systems: a commercial and regulatory outlook as the field matures. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.851-864, 14 out. 2016.

RIGHI, Adne Abbud et al. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 91, n. 13, p.2363-2370, 17 maio 2011.

SANDRI, Giuseppina et al. The Role of Particle Size in Drug Release and Absorption. In: MERKUS, Henk G.; MEESTERS, Gabriel M.h.. **Particulate Products: Tailoring Properties for Optimal Performance**. Pavia: Springer, 2014. Cap. 11. p. 323-341.

SCATOLINI, Antonio Márcio. **Estudo de hidróxiapatita contendo própolis de origem brasileira**: caracterização, atividade antimicrobiana e efeito citotóxico dos materiais. 2017. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

SFORCIN, José M.. Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 30, n. 6, p.894-905, 14 mar. 2016.

SHARAF, S.; HIGAZY, A.; HEBEISH, A.. Propolis induced antibacterial activity and other technical properties of cotton textiles. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 59, p.408-416, ago. 2013.

SHAHVERDI, Ahmad R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.168-171, jun. 2007.

SHEN, Zhu; KAMDEM, Donatien Pascal. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 74, p.289-296, mar. 2015.

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.. Infrared Spectroscopy. In: SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J.. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. New York: John Wiley & Sons, 2005. Cap. 2. p. 72-126.

SINGER, Anthony; BARAKAT, Zein; MOHAPATRA, Subhra. Nanoscale Drug-Delivery Systems: In Vitro and In Vivo Characterization. In: MOHAPATRA, Shyam S.; RANJAN, Shivendu; DASGUPTA, Nandita. **Nanocarriers for Drug Delivery: Nanoscience and nanotechnology in drug delivery**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 395-419.

SIRIPATRAWAN, Ubonrat; VITCHAYAKITTI, Waranya. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. **Food Hydrocolloids**, [s.l.], v. 61, p.695-702, dez. 2016.

STUART, Barbara H.. Organic Molecules. In: STUART, Barbara H.. **Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004. Cap. 4. p. 71-94.

SUÁREZ, Dámarys; ZAYAS, Daniel; GUISADO, Frenkel. Propolis: Patents and technology trends for health applications. **Journal Of Business Chemistry**. Havana, p. 119-125. set. 2005.

SUNG, Jean C.; PULLIAM, Brian L.; EDWARDS, David A.. Nanoparticles for drug delivery to the lungs. **Trends In Biotechnology**, [s.l.], v. 25, n. 12, p.563-570, dez. 2007.

SUTJARITTANGTHAM, Krit et al. Bactericidal effects of propolis/poly(lactic acid) (PLA) nanofibres obtained via electrospinning. **Journal of Apicultural Research**, [s.l.], v. 53, n. 1, p.109-115, jan. 2014.

TAGLIARI, Monika P. et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1228-1232, 2012.

TAVARES, Idylla Silva. **Obtenção e caracterização de nanopartículas de quitosana.** 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2011.

WANG, Wenlong et al. Poly(lactic acid)/chitosan hybrid nanoparticles for controlled release of anticancer drug. **Materials Science And Engineering: C**, [s.l.], v. 46, p.514-520, jan. 2015.

WILSON, Barnabas et al. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.144-152, fev. 2010.

WOJTYCZKA, Robert D. et al. In Vitro Antimicrobial Activity of Ethanolic Extract of Polish Propolis against Biofilm Forming Staphylococcus epidermidis Strains. Evidence-based Complementary And Alternative Medicine, [s.l.], v. 2013, p.1-11, 2013.

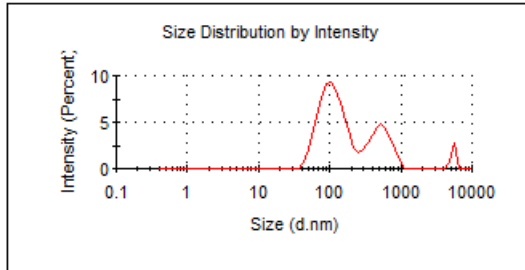
YUAN, Xu-bo et al. Preparation of rapamycin-loaded chitosan/PLA nanoparticles for immunosuppression in corneal transplantation. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 349, n. 1-2, p.241-248, 12 fev. 2008.

ZHANG, L et al. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 83, n. 5, p.761-769, 24 out. 2007.

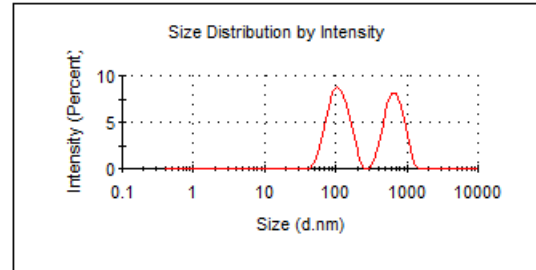
ZHANG, X. Nasal absorption enhancement of insulin using PEG-grafted chitosan nanoparticles. **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, [s.l.], v. 68, n. 3, p.526-534, mar. 2008.

ANEXO A – DLS: Intensidade (%) x tamanho de partículas (nm)

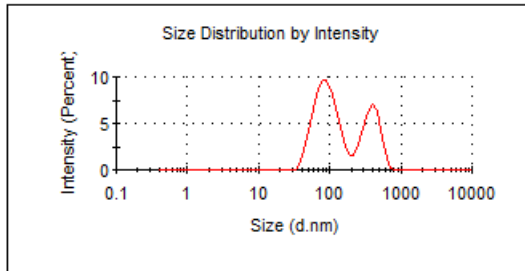
PLA:QUI 1



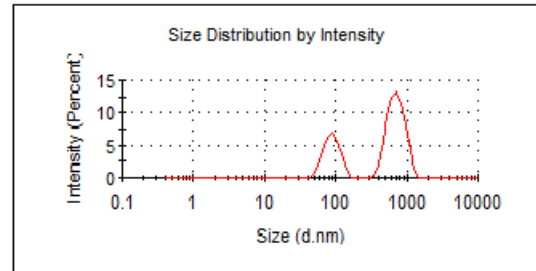
PLA:QUI 1 + PROP



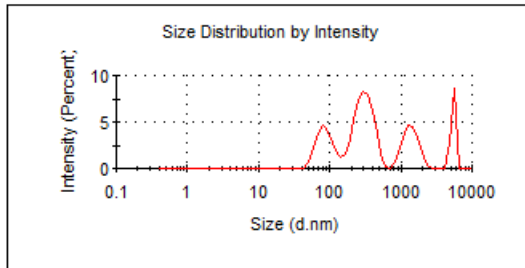
PLA:QUI 2



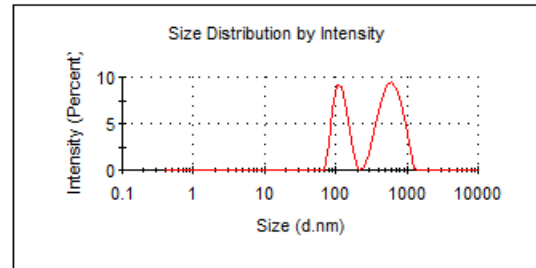
PLA:QUI 2 + PROP



PLA:QUI 3



PLA:QUI 3 + PROP



ANEXO B – Curva de calibração de quercetina