

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

NADIA OBROWNICK OKAMOTO SCHALCH

Estabilização de compostos ativos de própolis vermelha em sistemas híbridos de nanoceluloses e TPP-quitossomas: potencial aplicação em criogéis

Pirassununga / SP

2024

NADIA OBROWNICK OKAMOTO SCHALCH

Estabilização de compostos ativos da própolis vermelha em sistemas híbridos de nanoceluloses e TPP-quitossomas: potencial aplicação em criogéis

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora do programa de pós-graduação em Engenharia e Ciência de Materiais.

Área de Concentração: Desenvolvimento, Caracterização e Aplicação de Materiais Voltados à Agroindústria.

Orientadora: Profa. Dra. Milena Martelli Tosi

Pirassununga / SP

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O41e Okamoto-Schalch, Nadia Obrownick
Estabilização de compostos ativos de própolis
vermelha em sistemas híbridos de nanoceluloses e TPP-
quitossomas: potencial aplicação em criogéis / Nadia
Obrownick Okamoto-Schalch ; orientadora Milena
Martelli-Tosi. -- Pirassununga, 2024.
107 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia e Ciência de Materiais) -- Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade
de São Paulo.

1. flavonoides. 2. encapsulação. 3. própolis. 4.
criogel. 5. nanocristais de celulose. I. Martelli-
Tosi, Milena, orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

À professora Milena pela sua dedicação ao longo de todo o projeto, sempre cheia de otimismo.

AGRADECIMENTOS

À minha família, Fernando, Cadu e Maria, que estiveram ao meu lado e acreditaram em mim.

À minha orientadora Milena Martelli Tosi, por todos os ensinamentos e pela paciência. Obrigada por me incentivar na pesquisa.

Ao técnico do laboratório, Marcelo Thomazini, pelos conhecimentos compartilhados, pela amizade e conselhos.

Aos colegas de laboratório LENALIS, obrigada pela paciência, troca de conhecimentos, pelas risadas e companheirismo.

Aos professores, obrigada pelos ensinamentos, conselhos e sugestões.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais pela oportunidade.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos recursos financeiros aos projetos de pesquisa (Processos 2019/23717-1 e 2022/03469-9)

A todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte dessa jornada, o meu muito obrigada.

RESUMO

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. **Estabilização de compostos ativos da própolis vermelha em sistemas híbridos de nanoceluloses e TPP-quitossomas: potencial aplicação em criogéis.** 2024. 110 p – Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2024.

Sistemas de tripolifosfato de sódio (TPP)-quitossomas foram estudados evidenciando o potencial deste sistema na encapsulação de compostos ativos comparado com apenas lipossomas. Agentes de reforço como nanocristais de celulose (CNs) também já foram estudados para melhorar a liberação controlada e estabilidade formando sistemas híbridos. Entretanto, até o presente, não foram encontrados estudos que relatam a associação de CNs em partículas de TPP-quitossomas para encapsulação e estabilização de compostos ativos. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi produzir e caracterizar sistemas híbridos de CN-TPP-quitossomas para encapsulação de extrato de própolis vermelha (PE) e aplicar estes sistemas em criogéis a base de quitosana. Neste contexto, este trabalho está dividido em três etapas: i) extração e caracterização da própolis vermelha; ii) produção e caracterização do sistema híbrido de CN- TPP-quitossomas contendo ou não extrato de própolis vermelha e iii) produção e caracterização de criogels contendo ou não extrato de própolis vermelha no sistema híbrido de CN-TPP-quitossomas. O PE foi obtido utilizando extração assistida por ultrassom com solução hidroetanólica de 84,5% de etanol variando a concentração de própolis. As caracterizações realizadas foram da concentração de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante. A amostra com maiores valores foi de 25 g propolis / 100 mL de solução hidroetanólica. As CNs foram obtidas por hidrólise ácida da vagem de soja mercerizada. O sistema híbrido foi obtido com a incorporação de CNs nos lipossomas recobertos com quitosana e sua gelificação iônica com TPP. Esse sistema híbrido foi adicionado aos hidrogéis para obtenção de criogéis produzidos por liofilização. Os sistemas produzidos apresentaram eficiência de encapsulação acima de 90 % tanto com relação aos compostos fenólicos totais como para flavonoides, entretanto os flavonoides apresentaram maiores taxas de aprisionamento. A distribuição de tamanho espalhamento de luz dinâmico e o potencial zeta dos sistemas indicaram que os lipossomas foram recobertos com a quitosana e a incorporação de CN causou a diminuição do potencial zeta das suspensões (de -3 mV para valores maiores que +30 mV). A microscopia eletrônica de transmissão corroborou com os resultados obtidos de tamanho das partículas. A adição de partículas influenciaram as propriedades dos criogéis.

A adição de nanocristais de celulose, melhorou a estrutura dos criogéis de lipossoma com mucoadesividade *in situ* aprimorada e liberação de flavonoides evidenciada. Enquanto os criogéis com partículas de quitossomas e TPP-quitossomas apresentaram tamanhos de poros menores, molhabilidade reduzida e um perfil de liberação de flavonoides mais baixo.

Palavras-Chave: Própolis. Flavonoides. Encapsulação. TPP. Quitossomas. Lipossomas. Nanocristais de celulose. Criogel.

ABSTRACT

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. **Stabilization of red propolis active compounds in hybrid systems of TPP-chitosomes and nanocelluloses: potential application in cryogels.** 2024. 110p – Qualifying (Doctorate Degree) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2024

Sodium tripolyphosphate (TPP)-chitosome systems were studied, highlighting the potential of this system in encapsulating active compounds compared to liposomes alone. Reinforcing agents such as cellulose nanocrystals (CNs) have also been studied to improve controlled release and stability by forming hybrid systems. However, to date, no studies have been found that report the association of CNs in TPP-chitosome particles for encapsulation and stabilization of active compounds. Thus, the general objective of this work was to produce and characterize CN-TPP-chitosome hybrid systems for encapsulating red propolis (PE) extract and apply these systems in chitosan-based cryogels. In this context, this work is divided into three stages: i) extraction and characterization of red propolis; ii) production and characterization of the CN-TPP-chitosome hybrid system containing or not red propolis extract and iii) production and characterization of cryogels containing or not red propolis extract in the CN-TPP-chitosome hybrid system. The PE was obtained using ultrasound-assisted extraction with an 84.5% ethanol hydroethanolic solution varying the concentration of propolis. Characterizations performed included the concentration of total phenolic compounds, flavonoids, and antioxidant activity. The sample with the highest values had 25 g of propolis per 100 mL of hydroethanolic solution. CNs were obtained by acid hydrolysis of mercerized soybean pods. The hybrid system was obtained with the incorporation of CNs in liposomes covered with chitosan and their ionic gelation with TPP. This hybrid system was added to hydrogels to obtain cryogels produced by freeze-drying. The systems produced showed encapsulation efficiency above 90% for both total phenolic compounds and flavonoids, however flavonoids showed higher entrapment rates. The dynamic light scattering size distribution and the zeta potential of the systems indicated that the liposomes were covered with chitosan and the incorporation of CN caused a decrease in the zeta potential of the suspensions (from -3 mV to values greater than +30 mV). Transmission electron microscopy corroborated the particle size results obtained. The addition of particles influenced the properties of the cryogels. The addition of cellulose nanocrystals improved the structure of liposome cryogels with improved in situ mucoadhesiveness and evidenced

flavonoid release. While cryogels with chitosome and TPP-chitosome particles showed smaller pore sizes, reduced wettability and a lower flavonoid release profile.

Keywords: Propolis. Flavonoids. Encapsulation. TPP. Qitosomes. Liposomes. Cellulose nanocrystal. Cryogel.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Estudos de extração da própolis e caracterização quanto à quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante.....	28
Tabela 1.2. Estudos realizados com própolis para melhorar estabilidade dos compostos ativos ou melhorar a cicatrização de feridas.	30
Tabela 1.3. Estudos realizados com encapsulação de compostos ativos utilizando quitossomas e TPP-quitossomas.	34
Tabela 1.4. Estudos realizados com géis secos para melhora na cicatrização de feridas.....	43
Tabela 2.1. Resultados preliminares obtidos da quantificação de CFTs do PE obtido em ultrassom de ponteira.....	55
Tabela 2.2. Valores de compostos fenólicos totais (CFTs), flavonoides, atividade antioxidante por ABTS e FRAP das amostras com diferentes concentrações de própolis utilizada na extração com solvente hidroetanólico 84,5% de etanol.	56
Tabela 3.1. Identificação e composição final das amostras.....	65
Tabela 3.2. Eficiência de encapsulação das partículas carregadas com extrato de própolis vermelha pela quantificação de CFT e flavonoides. Sendo L-PE, lipossoma; Ch-PE, quitossomas; TPPCh-PE, TPP-quitossomas; CN-L-PE, lipossomas com nanocristais; CN-Ch-PE, quitossomas com nanocristais e CN-TPPCh-PE, TPP-quitossomas com nanocristais.....	70
Tabela 3.3. Diâmetro médio (<i>Z-average</i>) (nm) e índice de polidispersidade (PDI) das partículas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta (mV) das suspensões.	74
Tabela 4.1. Composição das amostras de criogel produzidas para avaliação preliminar.....	90
Tabela 4.2. Amostras produzidas com concentração de 0,5 % (m/v) de quitosana.	90
Tabela 4.3. Ângulo de contato dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE, nos tempos 15, 30 e 60 segundos em ambos os lados (lado A, em contato com o ar e lado P em contato com a placa).....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura química dos flavonoides.....	25
Figura 1.2. Esquema do sistema TPP-quitossomas.....	31
Figura 1.3. Micrografias de nanocelulose obtidas a partir da palha de soja mercerizada por hidrólise (A) enzimática ou (B) ácida.....	38
Figura 1.4. Esquema da estrutura do sistema híbrido de TPP-quitossomas com CNs.....	39
Figura 1.5. Esquema dos parâmetros que influenciam o desempenho dos hidrogéis porosos.	41
Figura 3.1. Fluxograma de pré-tratamento da soja para obtenção de nanocristais de celulose.	62
Figura 3.2. Fluxograma de tratamento ácido da vagem e/ou de soja pré-tratada para obtenção de nanocristais de celulose.	63
Figura 3.3. Fluxograma de tratamento de fragmentação mecânica da vagem e/ou palha de soja para obtenção de nanocristal de celulose.....	63
Figura 3.4. Fluxograma de produção dos sistemas híbridos carregados de extrato de própolis.	65
Figura 3.5. Suspensão de CNs.....	68
Figura 3.6. (A) Micrografia representativa da estrutura das CNs e (B) perfil de altura (nm) obtidos por microscopia de força atômica (AFM).	69
Figura 3.7. Micrografias MET: (1) partículas e não carregadas com PE: lipossomas (L), quitossomas (Ch) e TPP-quitossomas (TPPCh) sem nanocristais de celulose (A, B e C, respectivamente) e com nanocristais de celulose (D, E e F, respectivamente); (2) Partículas carregadas com extrato de própolis.....	72
Figura 3.8. Espectros FTIR das: (A) das partículas vazias produzidas com CN: lipossomas (CN-L), quitossomas (CN-Ch) e TPP-quitossomas (CN-TPP-Ch), (B) partículas carregadas com extrato de própolis (PE) e sem CNs e (C) partículas carregadas com PE na presença de CN.....	76
Figura 3.9. Degradação térmica em função da temperatura (TGA e DTG) das: (A) das partículas vazias produzidas com CN: lipossomas (CN-L), quitossomas (CN-Ch) e TPP-quitossomas (CN-TPP-Ch), (B) partículas carregadas com extrato de própolis (PE) e sem CNs e (C) partículas carregadas com PE na presença de CN.....	79
Figura 4.1. Descrição do ângulo de contato formado pela tangente à superfície do líquido no contato com o criogel.	87

Figura 4.2. Texturômetro com a pele fixada para análise de mucoadesividade.	88
Figura 4.3. Imagens das amostras de criogéis com diferentes concentrações de partículas e quitosana, conforme Tabela 6. (A) Amostra A (2000 mg de Ch/100 mL de criogel); (B) Amostra B (1500 mg de Ch/100 mL de criogel e 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel); (C) Amostra C (1000 mg de Ch/100 mL de criogel e 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel); (D) Amostra D (500 mg de Ch/100 mL de criogel e 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel) e (E) Amostra E (224,4 mg de partículas/100 mL de criogel).	91
Figura 4.4. Micrografias das amostras com variação da concentração de quitosana e partículas, conforme Tabela 4.1. (A) Amostra A (2000 mg de Ch/100 mL de criogel); (B) Amostra B (1500 mg de Ch/100 mL de criogel e 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel); (C) Amostra C (1000 mg de Ch/100 mL de criogel e 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel); (D) Amostra D (500 mg de Ch/100 mL de criogel e 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel) e (E) Amostra E (224,4 mg de partículas/100 mL de criogel).	92
Figura 4.5. Imagens das amostras com concentração de quitosana de 500 mg de quitosana/100 mL de criogel e diferentes concentrações de partículas: (A) 0 (controle, Amostra F), (B) 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra G), (C) 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel (amostra H) e (C) 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra I).	93
Figura 4.6. Micrografias das amostras com concentração de quitosana de 500 mg de quitosana/100 mL de criogel e diferentes concentrações de partículas: (A) 0 (controle, Amostra F), (B) 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra G), (C) 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel (amostra H) e (C) 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra I).	94
Figura 4.7. Imagens dos criogéis contendo partículas carregadas de extrato de própolis: (A) Criogel_Ch-PE; (B) Criogel_TPPCh PE; (C) Criogel_CN-L PE; (D) Criogel_CN-Ch PE and (E) Criogel_CN-TPPCh PE.....	95
Figura 4.8. Micrografias (MEV) dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE: (A) Criogel_L-PE; (B) Criogel_Ch- PE ; (C) Criogel_TPPCh- PE ; (D) Criogel_CN-L- PE ; (E) Criogel_CN-Ch- PE ; (F) Criogel_CN-TPPCh- PE.	97
Figura 4.9. Espectros FTIR dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE: (A) Criogel_L-PE; (B) Criogel_Ch- PE; (C) Criogel_TPPCh- PE; (D) Criogel_CN-L- PE; (E) Criogel_CN-Ch- PE; (F) Criogel_CN-TPPCh- PE.	99
Figura 4.10. Ângulo de contato dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE, nos tempos 15, 30 e 60 segundos em ambos os lados (lado A, em contato com o ar e lado	

P em contato com a placa): (A) Criogel_L-PE; (B) Criogel_Ch- PE; (C) Criogel_TPPCh- PE;
(D) Criogel_CN-L- PE; (E) Criogel_CN-Ch- PE; (F) Criogel_CN-TPPCh- PE. 102

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REFERÊNCIAS	20
CAPÍTULO 1 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
1.1. Própolis vermelha.....	24
1.1.1. Extração de compostos ativos da própolis.....	26
1.2. Encapsulação	29
1.2.1. TPP-quitossomas	31
1.2.2. Nanocristais de celulose	36
1.3. Criogéis.....	40
REFERÊNCIAS	44
CAPÍTULO 2 . EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DA PRÓPOLIS VERMELHA.....	50
2.1. Introdução.....	51
2.2. Material e métodos	52
2.2.1. Material.....	52
2.2.2. Extração e quantificação de compostos ativos	52
2.2.2.1. Compostos fenólicos	53
2.2.2.2. Flavonoides	53
2.2.2.3. Atividade antioxidantes.....	53
2.2.3. Análise estatísticas.....	54
2.3. Resultados e discussão	54
2.4. Conclusão	56
REFERÊNCIAS	57

CAPÍTULO 3 . ENCAPSULAÇÃO DE COMPOSTOS ATIVOS DE PRÓPOLIS VERMELHA EM LIPOSSOMAS, QUITOSSOMAS E TPP-QUITOSSOMAS COM E SEM NANOCRISTAIS DE CELULOSE 59

3.1. Introdução.....	60
3.2. Material de métodos	61
3.2.1. Material.....	61
3.2.2. Produção de Nanocristais de celulose.....	61
3.2.2.1 Caracterização das CNs.....	63
3.2.3. Encapsulação	64
3.2.2.2 Eficiência de Encapsulação	65
3.2.4. Caracterização das partículas.....	66
3.2.3.1. Morfologia.....	66
3.2.3.2. Tamanho de partícula e potencial zeta	66
3.2.3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	66
3.2.3.4. Análise termogravimétrica	67
3.2.5. Análise estatística	67
3.3. Resultados e discussão	67
3.3.1. Produção de nanocristais de celulose (CN)	67
3.3.2. Encapsulação do extrato	69
3.3.3. Caracterização das partículas.....	70
3.3.2.1. Morfologia.....	70
3.3.2.2. Tamanho de partícula e potencial zeta	73
3.3.2.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	75
3.3.2.4. Análise termogravimétrica	77
3.4. Conclusão	80
REFERÊNCIAS	81

CAPÍTULO 4 . ELABORAÇÃO DE CRIOGÉIS ATIVOS DE QUITOSANA CONTENDO COMPOSTOS ATIVOS ENCAPSULADOS EM TPP-QUITOSSOMAS E NANOCRISTAIS DE CELULOSE 84

4.1.	Introdução	85
4.2.	Material de métodos	86
4.2.1.	Material.....	86
4.2.2.	Elaboração de criogéis ativos de quitosana contendo compostos ativos encapsulados em TPP-quitossomas e nanocristais de celulose	86
4.2.3.	Caracterização dos criogéis	86
4.2.3.1.	Morfologia.....	86
4.2.3.2.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	87
4.2.3.3.	Ângulo de contato	87
4.2.3.4.	Mucoadesividade e liberação de flavonoides.....	88
4.2.4.	Análise estatística	89
4.3.	Resultados e discussão	89
4.3.1.	Testes preliminares	89
4.3.2.	Elaboração dos criogéis	95
4.3.3.	Caracterização dos criogéis	95
4.3.3.1.	Morfologia.....	95
4.3.3.2.	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier	98
4.3.3.3.	Ângulo de contato	99
4.3.3.4.	Mucoadesividade e liberação de flavonoides.....	101
4.4.	Conclusão	102
	REFERÊNCIAS	104
	CAPÍTULO 5 . CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	106

INTRODUÇÃO

A própolis é um material resinoso produzido pelas abelhas e seu uso ocorre desde a antiguidade. As propriedades farmacológicas e a composição começaram a ser pesquisadas principalmente na década de 1950 (GHISALBERTI, 1979; MEYER; ULRICH, 1956). Burdock (1998) confirma as ações antissépticas, antimicóticas, bacteriostáticas, anti-inflamatórias, anestésicas e antioxidantes da própolis que atraem tantas pessoas a consumirem seus extratos. Essas propriedades devem-se principalmente à presença de compostos fenólicos totais (CFT) (BODINI et al., 2013).

Alguns fatores afetam a estabilidade dos ativos, diminuindo as propriedades tão almejadas. Estudos de estabilidade realizados com própolis verde por Arruda et al. (2020) demonstraram que o composto fenólico artepelin C é sensível à luz e temperatura. Já o p-cumárico é estável a ambas condições separadas, porém se a luz e a temperatura forem aplicadas simultaneamente, o p-cumárico se degrada. Arruda et al. (2020) relataram que a melhor condição de armazenamento e transporte para o artepelin C são temperaturas abaixo de -2,5 °C e proteção à luz. Já o p-cumárico pode ser armazenado à temperatura ambiente, entretanto em embalagem com proteção à luz.

Além da estabilidade no armazenamento, outra questão importante para o consumo / uso dos extratos de própolis é a liberação controlada dos compostos ativos, para que estejam disponíveis no momento desejado. Caso ingerido, a liberação deve ocorrer no intestino ou, no caso de adicionado em curativos, os compostos possam ser liberados ao longo do período de uso do mesmo. A encapsulação de compostos bioativos pode melhorar sua biodisponibilidade, estabilidade e possibilita a liberação controlada do ativo. Nas cápsulas, os compostos ativos são empacotados, e podem ser liberados de forma controlada e sob condições específicas, como pH, luz e umidade, além de proteger de fatores que afetam a estabilidade (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

Busch et al. (2017) concluíram que a própolis encapsulada através da secagem por atomização (*spray-drying*), utilizando maltodextrina e goma arábica como veiculadores, produziu maior retenção de CFT do que no sistema sem goma arábica. Diversos estudos estão sendo feitos visando a estabilidade e liberação controlada do extrato de própolis (CORRÊA et al., 2017; DALPONTE DALLABONA et al., 2020; EBADI; FAZELI, 2021; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; REFAAT et al., 2021; ROJCZYK et al., 2020; WANG et al., 2021). Refaat et al. (2021) produziram um sistema de lipossomas para encapsular própolis e melhorar a disponibilidade, devido à natureza pegajosa e resinosa do extrato de própolis. Esse estudo

visou formular um sistema nanocarreador para o tratamento de COVID-19, e a análise da atividade antiviral do extrato com estudos automatizados de *docking* mostrou o grande impacto da encapsulação lipossomal em potencializar o efeito inibitório da própolis encapsulada contra a replicação do vírus em comparação com o extrato de própolis não encapsulado.

Entretanto os lipossomas têm baixa resistência ao pH ácido e são muito vulneráveis à ação enzimática. A formação de uma camada externa de quitosana, pode melhorar significativamente sua estabilidade, configurando os quitossomas (ESPOSTO et al., 2021). A quitosana (Ch) é formada por unidades de glucosamina (β -(1-4)- 2-amino-2-desoxi-D-glicose e β -(1-4)-2-acetamida-2-desoxi-D-glicose). Esse polímero pode ser obtido do exoesqueleto de crustáceos por meio da desacetilação da quitina em meio alcalino (KUMAR et al., 2004). As principais características da quitosana são: insolubilidade em meio aquoso de pH neutro e alguns solventes orgânicos, tem propriedades antimicrobianas, baixa toxicidade e biodegradabilidade (DEVI; DUTTA, 2017).

A quitosana já foi estudada para produção de nanopartículas por reticulação iônica usando tripolifosfato de sódio (TPP). Esse processo de gelificação ocorre quando os grupos amino da quitosana carregados positivamente se ligam aos grupos negativos do TPP (BRITTO et al., 2014; HOSSEINI et al., 2013; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Outros estudos também indicam que adicionar TPP a estrutura dos quitossomas, formando o sistema TPP-quitossomas, também pode melhorar a proteção dos compostos ativos encapsulados (CADDEO et al., 2016; IIDA et al., 2020).

Outro veiculador de compostos ativos são as nanoceluloses, produzidas a partir de tratamentos químicos ou enzimáticos, associados a processos mecânicos de materiais lignocelulósicos (KARGARZADEH et al., 2017a), dentre elas a palha da soja mercerizada (MARTELLI-TOSI et al., 2017, 2018). Dependendo do tratamento, pode-se obter nanofibrilas (hidrólise enzimática e/ou fragmentação mecânica, com comprimento micrométrico) ou nanocristais de celulose (CNs) (hidrólise ácida e fragmentação mecânica, com comprimentos menores que 1 μ m). Ambos possuem diâmetros em escala nanométrica (MARTELLI-TOSI et al., 2018). Uma característica importante dos nanocristais de celulose obtida a partir da hidrólise com ácido sulfúrico é sua carga aniônica dos grupos OSO_3^- e aos grupos hidroxilas (OH) presentes na superfície de CNs podem facilitar a ligação com grupos hidrofóbicos ou não ionizados de outros compostos. As CNs possuem comprimento muito maior que seu diâmetro, portanto possui grande superfície de contato, tornando-se uma matriz capaz de carregar ativos principalmente insolúveis em água pela adsorção desses compostos na fibra (KOLAKOVIC et al., 2012).

Alguns estudos foram realizados utilizando as CNs na formação de sistemas híbridos com quitosana (AKHLAGHI et al., 2014; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Okamoto-Schalch et al. (2020) verificaram que a adição de CNs nas nanopartículas quitosana reticuladas com TPP apresentaram boa ação protetora de ácido fólico, principalmente como barreira em meio ácido. Até o presente, não foram encontrados trabalhos que visam a produção de sistemas híbridos associando TPP-quitossomas e CNs. Esta associação pode ser de potencial interesse, para encapsulação e liberação controlada de compostos ativos da própolis em TPP-quitossomas, bem como carga de reforço em filmes biodegradáveis ou géis secos.

A produção de filmes de gel como sistema oral de administração de medicamentos já foi avaliada para uma liberação controlada, melhorando a bioatividade e a estabilidade do fármaco (WANG et al., 2020a).

Os géis secos podem ser obtidos a partir de diferentes técnicas de secagem, diferindo em relação à estrutura porosa e, conseqüentemente, às propriedades mecânicas e de permeabilidade. Eles são identificados como aerogéis, criogéis ou xerogéis quando os processos de secagem são, respectivamente: supercrítica, liofilização ou evaporação à temperatura ambiente. A porosidade destes géis secos a base de celulose ou quitosana pode variar de 70-80%, para xerogéis, até 90-96% para aerogéis e criogéis (GANESAN et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Portanto, os criogéis possuem diversas propriedades excepcionais, sendo utilizado para inúmeras aplicações e, quando obtidos a partir de material biocompatível, podem ser usados como curativos ou veículos de ativos (BÖLGEN et al., 2020; CHEN et al., 2021; ESKANDARINIA et al., 2020; SHIEKH; SINGH; KUMAR, 2020; WANG et al., 2020b; ZHANG et al., 2016).

Assim, a estratégia principal deste trabalho é encapsular compostos ativos da própolis em sistemas híbridos e adicionar as partículas aos criogéis poliméricos para fabricar um produto com uso potencial na farmacologia. Diante disso, um dos maiores desafios é a liberação controlada do extrato de própolis inserido no criogel para auxiliar na absorção intestinal.

Até esta ocasião, não há pesquisas sobre o estudo da associação de TPP-quitossomas e CNs para estabilização de compostos ativos em criogéis. Assim, este trabalho tem como hipóteses: (i) o sistema híbrido TPP-quitossomas-CNs pode proteger os compostos ativos durante a liberação controlada do extrato de própolis vermelha por mais tempo, evitando sua degradação durante a ação prolongada; e (ii) o sistema híbrido pode melhorar as propriedades mecânicas e de permeabilidade dos criogéis a base de quitosana devido à presença das CNs em sua estrutura.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo é produzir e caracterizar criogéis bioativos contendo extrato de própolis vermelha encapsulado em sistemas híbridos de nanoceluloses e TPP-quitossomas.

Os objetivos específicos estão discriminados a seguir:

- Produção e caracterização de extrato de própolis vermelha utilizando ultrassom de ponteira e solução hidroetanólica;
- Produção e caracterização dos sistemas híbridos a base de TPP-quitossomas e nanoceluloses;
- Encapsulação de extrato de própolis vermelha nos sistemas híbridos;
- Produção e caracterização de criogéis contendo compostos bioativos da própolis vermelha encapsulados nos sistemas híbridos.

Considerando tais objetivos, este trabalho está dividido em quatro capítulos descritos a seguir:

Capítulo 1: apresenta uma revisão bibliográfica sobre os assuntos abordados na pesquisa de doutorado, sendo a própolis, os compostos ativos, a extração dos compostos, os nanocristais de celulose, a encapsulação dos ativos em lipossomas recobertos com quitosana e suas aplicações em criogéis.

Capítulo 2: aborda o estudo da extração dos compostos ativos utilizando solução hidroetanólica e ultrassom de ponteira.

Capítulo 3: descreve o estudo da encapsulação do extrato de própolis vermelha em lipossomas, quitossomas e TPP-quitossomas com e sem a presença de nanocristais de celulose.

Capítulo 4: apresenta a aplicação das partículas híbridas contendo extrato de própolis encapsulado em criogéis de quitosana.

REFERÊNCIAS

- AKHLAGHI, S. P. et al. Comparative release studies of two cationic model drugs from different cellulose nanocrystal derivatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 207–215, 1 set. 2014.
- ARRUDA, C. et al. Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artemisinic acid and p-coumaric acid from Brazilian green propolis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 178, 2020.
- BODINI, R. B. et al. Properties of gelatin-based films with added ethanol-propolis extract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 51, n. 1, p. 104–110, 2013.
- BÖLGEN, N. et al. Development of Hypericum perforatum oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1581–1590, 15 out. 2020.
- BRITTO, D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 22, n. 12, p. 1261–1267, 2014.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.
- BUSCH, V. M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227–235, 2017.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69–78, 2016.
- CHEN, T. Y. et al. Cryogel/hydrogel biomaterials and acupuncture combined to promote diabetic skin wound healing through immunomodulation. **Biomaterials**, v. 269, n. 161, p. 120608, 2021.
- CORRÊA, F. R. S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NF κ B. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 162–171, 1 fev. 2017.
- DALPONTE DALLABONA, I. et al. Development of alginate beads with encapsulated jaboticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1421–1432, 2020.
- DEVI, N.; DUTTA, J. Preparation and characterization of chitosan-bentonite nanocomposite films for wound healing application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 1897–1904, 1 nov. 2017.
- EBADI, P.; FAZELI, M. Evaluation of the potential in vitro effects of propolis and honey on wound healing in human dermal fibroblast cells. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 414–422, 1 mar. 2021.

- ESKANDARINIA, A. et al. A propolis enriched polyurethane-hyaluronic acid nanofibrous wound dressing with remarkable antibacterial and wound healing activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 467–476, 15 abr. 2020.
- ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 40–48, 1 fev. 2021.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. DE. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.
- GANESAN, K. et al. Design of aerogels, cryogels and xerogels of cellulose with hierarchical porous structures. **Materials and Design**, v. 92, p. 345–355, 15 fev. 2016.
- GHISALBERTI, E. L. Propolis: A Review. **Bee World**, v. 60, n. 2, p. 59–84, 31 jan. 1979.
- HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.
- IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polimeros**, v. 29, n. 4, p. 1–8, 2020.
- KARGARZADEH, H. et al. Methods for Extraction of Nanocellulose from Various Sources. **Handbook of Nanocellulose and Cellulose Nanocomposites**, p. 1–49, 2017.
- KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163–171, 2011.
- KOLAKOVIC, R. et al. Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 308–315, 2012.
- KUMAR, M. N. V. R. et al. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017–6084, 2004.
- MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 570–578, 2019.
- MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 512–520, fev. 2017.
- MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61–68, out. 2018.
- MEYER, W.; ULRICH, W. “Propolis Bees” and Their Activities. **Bee World**, v. 37, n. 2, p. 25–36, fev. 1956.

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Production and characterization of chitosan-TPP/cellulose nanocrystal system for encapsulation: a case study using folic acid as active compound. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5855–5869, 2020.

REFAAT, H. et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, n. November 2020, p. 120028, 2021.

ROJCZYK, E. et al. Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 17, 15 nov. 2020.

SHIEKH, P. A.; SINGH, A.; KUMAR, A. Exosome laden oxygen releasing antioxidant and antibacterial cryogel wound dressing OxOBand alleviate diabetic and infectious wound healing. **Biomaterials**, v. 249, p. 120020, 1 ago. 2020.

WANG, S. YA et al. A novel and simple oral colon-specific drug delivery system based on the pectin/modified nano-carbon sphere nanocomposite gel films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 157, p. 170–176, 15 ago. 2020a.

WANG, T. C. et al. Establishment of a propolis ethanolic extract self-microemulsifying drug delivery system and its antibacterial activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, n. li, p. 1–7, 2021.

WANG, Y. et al. Hierarchical micro/nanofibrous scaffolds incorporated with curcumin and zinc ion eutectic metal organic frameworks for enhanced diabetic wound healing via anti-oxidant and anti-inflammatory activities. **Chemical Engineering Journal**, v. 402, p. 126273, 15 dez. 2020b.

ZHANG, F. et al. Temperature-sensitive poly-NIPAm modified cellulose nanofibril cryogel microspheres for controlled drug release. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 415–425, 2016.

ZHANG, H. et al. Control of ice crystal growth and its effect on porous structure of chitosan cryogels. **Chemical Engineering Science**, v. 201, p. 50–57, 29 jun. 2019.

CAPÍTULO 1 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Própolis vermelha

A própolis desperta interesse de pesquisadores há décadas devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas, como a ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante, entre outras (CORRÊA et al., 2017; DALPONTE DALLFABONA et al., 2020; EBADI; FAZELI, 2021; MARQUELE-OLIVEIRA et al., 2019; REFAAT et al., 2021; ROJCZYK et al., 2020; WANG et al., 2021). A própolis é o nome dado a mistura de substâncias resinosas coletadas e transformadas pelas abelhas (BURDOCK, 1998; MARTINOTTI; RANZATO, 2015). Essa resina é coletada nas rachaduras das árvores e nos botões, é mastigada e com as enzimas salivares e cera própria de abelha, formam a própolis (BURDOCK, 1998). Esse material é utilizado na colmeia para revestir as partes internas e para proteção contra invasores, tanto animais quanto água e vento.

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) – Mel e produtos apícolas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) define no anexo VI que “entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração do produto” (BRASIL, 2001).

De acordo com a Instrução Normativa (BRASIL, 2001), as características da própolis são: aroma característico (balsâmico e resinoso); cor amarela, parda, esverdeada, marrom e outras; sabor característico de suave balsâmico a forte e picante; consistência maleável a rígida; granulometria heterogênea; perda por dessecação máximo de 8% (m/m); cinzas máximo de 25% (m/m); cera máximo de 25% (m/m); compostos fenólicos totais mínimo 5% (m/m); flavonoides mínimo de 0,5% (m/m); atividade de oxidação máximo de 22 segundos; massa mecânica máximo de 40% (m/m); solúveis em etanol mínimo de 35% (m/m); espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível deverá apresentar picos característicos das principais classes de flavonoides entre 200 e 400 nm, sendo essas características dependentes da origem botânica.

Ainda, de acordo com a RTIQ (BRASIL, 2001), a própolis pode ser classificada quanto ao teor de flavonoides. É considerado de baixo teor até 1,0% (m/m), médio teor de 1,0% a 2,0% (m/m) e de alto teor com valores acima de 2,0% (m/m)

Devido ao teor de flavonoides presentes na própolis, os compostos fenólicos totais (CFT) são amplamente estudados nos extratos (ANDRADE et al., 2017; HOCHHEIM et al., 2019; REVILLA et al., 2017). Esses compostos apresentam anéis aromáticos que contém, no

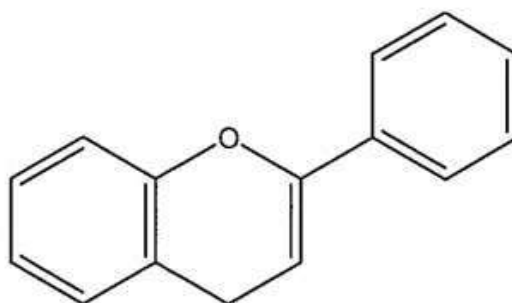
mínimo, uma hidroxila. Os que mais se evidenciam como fonte natural são os flavonoides (Figura 1.1), ácidos fenólicos, taninos e tocoferóis (ANGELO; JORGE, 2007).

Os CFTs são classificados como antioxidantes de interruptores de radicais livres, que retarda o aparecimento da oxidação (ANGELO; JORGE, 2007). Os radicais livres podem atacar as células, através de danos nas membranas celulares, nas enzimas e no material genético. O dano oxidativo às células tem sido causa de ampla variedade de doenças, como doenças degenerativas, doenças cardíacas e câncer (JACOB, 1995).

Os antioxidantes possuem a capacidade de eliminar ou desativar os radicais livres. Os antioxidantes do grupo fenólicos se ligam principalmente com o radical peroxil, devido à sua prevalência na etapa da autoxidação facilitando a remoção do hidrogênio. No entanto, a exposição à luz ultravioleta e alta temperaturas pode diminuir a funcionalidade dos antioxidantes. A eficiência desses antioxidantes geralmente é determinada pelos grupos funcionais presentes, pela sua posição no anel aromático e pelo tamanho da cadeia desses grupos.

Os antioxidantes fenólicos interagem, principalmente, com o radical peroxil por ser mais prevalente na etapa da autoxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio. O radical resultante é inerte e não tem capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas. A ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas pode favorecer a formação de novos radicais livres, comprometendo a eficiência dos antioxidantes. A eficiência é normalmente determinada pelos grupos funcionais presentes, pela posição que ocupam no anel aromático, bem como pelo tamanho da cadeia desses grupos (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 1.1. Estrutura química dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de Angelo e Jorge (2007) e Ramawat e Mérillon (2013).

Na década de 60, Swain e Hillis (1959) descreveram o método de Folin-Denis para a determinação de CFTs. Essa análise reduz o ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico com as hidroxilas fenólicas, gerando uma solução azul que absorve entre 620 e 740 nm na espectrometria UV-Vis. Atualmente a utilização do Folin-Denis foi substituída pelo Folin-Ciocalteu, pois diminui a tendência à precipitação (ANGELO; JORGE, 2007). Nessa metodologia utiliza-se o ácido gálico (GA) como referência na curva padrão, portanto o resultado é normalmente expresso em mg de GA/g de própolis.

Castro et al. (2014) indicaram a existência de 30 fenóis na própolis da região do Chile. Eles realizaram também, o estudo da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de própolis e verificaram que o éster feniletílico de ácido cafeico e a quercetina são os flavonoides presentes na própolis com melhor atividade antioxidante. Andrade et al. (2017) também identificaram os CFTs presentes na própolis e foram identificados 29 compostos. Os resultados, obtidos por Andrade et al. (2017), indicaram que as própolis marrom, verde e vermelha apresentam composição de perfil bioativo semelhante, mas quantitativamente diferente. A caempferida foi o composto majoritário (6,04 mg / g) na própolis verde, enquanto a própolis marrom continha maior quantidade de artepelin C (3,72 mg/g). Os principais compostos encontrados na própolis vermelha foram luteolina (1,75 mg/g), naringenina (0,96 mg/g), caempferol (0,59 mg/g), pinocembrina (0,41 mg/g) e biochanina A (0,39 mg/g).

1.1.1. Extração de compostos ativos da própolis

Os trabalhos que quantificam os CFTs são realizados no extrato própolis, obtido com o uso de álcool. Os principais álcoois utilizados para essa extração são o etanol e metanol (ANDRADE et al., 2017; CASTRO et al., 2014; HOCHHEIM et al., 2019; PARK et al., 1998; REVILLA et al., 2017; REYES; LANDGRAF; SOBRAL, 2021). Hochheim et al. (2019) e Revilla et al. (2017) mostraram que o metanol tem uma maior eficiência na extração dos CFTs, entretanto este álcool não é usado na indústria alimentícia e farmacêutica, uma vez que, durante a metabolização no organismo humano, forma-se ácido fórmico que é extremamente tóxico (BARCELOUX et al., 2002).

Assim como a própolis, o extrato também é definido pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) – Mel e produtos apícolas do MAPA no anexo VII: “entende-se por extrato de própolis o produto proveniente da extração dos componentes solúveis da própolis em álcool neutro (grau alimentício), por processo tecnológico adequado” (BRASIL, 2001).

A Instrução Normativa (BRASIL, 2001) também esclarece as características do extrato de própolis sendo aroma característico balsâmico e resinoso; cor com tons de âmbar, avermelhada e esverdeada, amargo a picante; aspecto líquido límpido e homogêneo; extrato seco mínimo de 115 (m/v); cera máximo de 1% (m/m); CFT mínimo 0,5% (m/m); compostos flavonoides mínimo de 0,25% (m/m); atividade de oxidação máximo de 22 segundos; teor alcoólico máximo de 70° GL (v/v); metanol máximo de 0,40 mg/L; espectro de absorção de radiações ultravioleta e visível, sendo que o extrato de própolis deve apresentar picos característicos das principais classes de flavonoides (entre 200 e 400 nm).

Diversos estudos apresentam a quantificação de CFTs nos extratos obtidos da própolis e podem ser observados na Tabela 1.1. Podendo ser observado que a extração com metanol é mais eficiente na extração assim como a adição de temperatura pode diminuir o tempo de extração. Mas os estudos em que há a utilização de ultrassom diminui drasticamente o tempo para obter extrato com altas concentrações de CFTs.

Tabela 1.1. Estudos de extração da própolis e caracterização quanto à quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante.

Referência	Abelha e/ou Própolis	Extração	CFTs	Flavonoides	Atividade Antioxidante
Park et al. (1998)	<i>Apis mellifera</i>	Etanol 80% / 70°C / 30min	-	-	1,5 mm
Hochheim et al. (2019)	<i>Melipona quadrifasciata</i>	Metanol / 25°C / 3-4 dias	57,53 mg GA / g de extrato	8,48 mg quercetina / g extrato	117,19 mg ácido ascórbico / 100g extrato (DPPH)
Revilla et al. (2017)	Espanha	Metanol / 15min / banho ultrassom	232,58 mg GA / g de própolis	16,16 mg quercetina / g de própolis	1774,9 µmol / g para a própolis galega e 1822,7 µmol / g para a própolis de Castela e Leão (ABTS)
Castro et al. (2014)	<i>A mellifera</i> Chile (Carucari)	Etanol 90% / 70°C / 30min	1,6 µmol ácido cafeico/mg de extrato	-	1,9 µmol ácido cafeico /mg extrato (FRAP)
Reyes et al. (2021)	Própolis vermelha Brasil (Alagoas)	Etanol absoluto / 25°C / 48h	233,3 mg GA/ g extrato	-	50,5% (ABTS)
Andrade et al. (2017)	Própolis marrom Brasil (Alagoas)	Etanol 70% / 35% / 60 min / banho ultrassom	55,7 mg GA/g de própolis	30,9 mg quercetina / g de própolis	-
Andrade et al. (2017)	Própolis vermelha Brasil (Alagoas)	Etanol 70% / 35% / 60 min / banho ultrassom	91,32 mg GA/g de própolis	31,48 mg quercetina/g de própolis	-
Andrade et al. (2017)	Própolis verde Brasil (Alagoas)	Etanol 70% / 35% / 60 min / banho ultrassom	90,55 mg GA/g de própolis	59,45 mg quercetina/g de própolis	-

Fonte: Própria autoria.

1.2. Encapsulação

O extrato é a forma mais comumente usada para a ingestão de própolis e, atualmente, a encapsulação é opção para assegurar as propriedades como a estabilidade e atividade biológica dos compostos do extrato. Essa técnica auxilia a incorporação dos extratos em alimentos e fármacos. Pesquisadores têm investigado várias metodologias para melhorar a estabilidade desses compostos. A Tabela 1.2 apresenta resumidamente os estudos que foram realizados com extrato de própolis, a tecnologia empregada e a finalidade.

Wang et al. (2021) estudaram a liberação de extrato de própolis na ingestão oral para melhorar a biodisponibilidade. Eles utilizaram um sistema auto-microemulsificante, onde o extrato de própolis foi dissolvido à fase oleosa, juntamente com os surfactantes. Essa solução foi submetida à agitação por 30 min e processo ultrassônico por 30 min para então ser incubada em banho-maria a 37 °C por 48h. A composição de 16% de óleo de milho com 84% de surfactante misto (Tween 80: álcool isopentílico na proporção 9:1) e concentração de extrato de 15,0 mg/100 mg de sistema era estável em três meses. Esse sistema mostrou atividade antimicrobiana eficaz contra fungos, bactérias gram-positivas e bactérias gram-negativas, pelo método de inibição.

Dallabona et al. (2020) encapsularam antocianinas e CFTs extraídos de casca de jabuticaba e da própolis utilizando alginato, por gelificação ionotrópica com gotejamento de solução de CaCl₂. A eficiência de encapsulação foi de 98% de polifenóis e diâmetro médio de 200 a 250 µm. A liberação *in vitro* realizada mostrou que, em pH 7,4, os ativos se degradaram, entretanto, em pH ácido (1,2), a liberação foi lenta, cerca de 40% em até 240 min.

Refaat et al. (2021) pesquisaram a ação antiviral da própolis contra o coronavírus SARS-COV-2, que causa a COVID-19. Os autores prepararam lipossomas por pulverização e a eficiência de encapsulação dosada a partir da concentração de flavonoides carregada e a concentração no extrato adicionado no sistema foi de até 81,8%. Os resultados mostraram que as nanocápsulas inibiram a replicação do vírus assim como outros antivirais estudados *in vitro*.

Tabela 1.2. Estudos realizados com própolis para melhorar estabilidade dos compostos ativos ou melhorar a cicatrização de feridas.

Referência	Origem do extrato	Tecnologia usada	Finalidade	Compostos fenólicos totais	Resultados importantes
Wang et al. (2021)	Própolis da <i>Sophora japonica</i>	auto-microemulsificante	Ingestão	18,36% de flavonoides no extrato	Melhorou a solubilidade e estabilidade
Dallabona, et al. (2020)	Própolis da <i>Scaptotrigona bipunctata</i>	Encapsulação com alginato (98,1 % EE)	Ingestão	6,76 mg GA/mL de extrato	6,21 μ mol de Trolox / g extrato
Refaat et al. (2021)	Própolis egípcia	Lipossomas (pulverização)	Ingestão (atividade antiviral contra COVID-19)	-	Efeito antiviral
Ebadi e Fazeli (2021)	Própolis marrom	Liofilização	-	1,85 mg GA / g extrato	100 μ g de extrato/ mL melhora a cicatrização
Rojezyk et al. (2020)	Própolis	Uso tópico/ filmes/pomada	Tratamento de feridas	-	Propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas
Correa et al. (CORRÊA et al., 2017)	Própolis vermelha	Ingestão	Tratamento de feridas	0,1763 mg GA / g extrato seco	Ingestão de 100 mg extrato/ kg animal melhorou processo de cicatrização de feridas.
Oliveira et al. (2019)	Própolis	Membrana bacteriana com própolis encapsulado por auto-microemulsificação	Curativo para queimaduras	Zona de inibição: até 40 mm	atividade antibacteriana in vitro e promoção da cicatrização

Fonte: Própria autoria.

Há alguns estudos sobre o uso de própolis na cicatrização, dentre eles, pode-se destacar o estudo de Oliveira et al. (2019). Eles produziram membrana de celulose bacteriana para tratar feridas de queimaduras através da tecnologia auto-microemulsificante para encapsulação da própolis. Os resultados demonstraram alta eficiência contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e a liberação foi sustentada por até 7 dias.

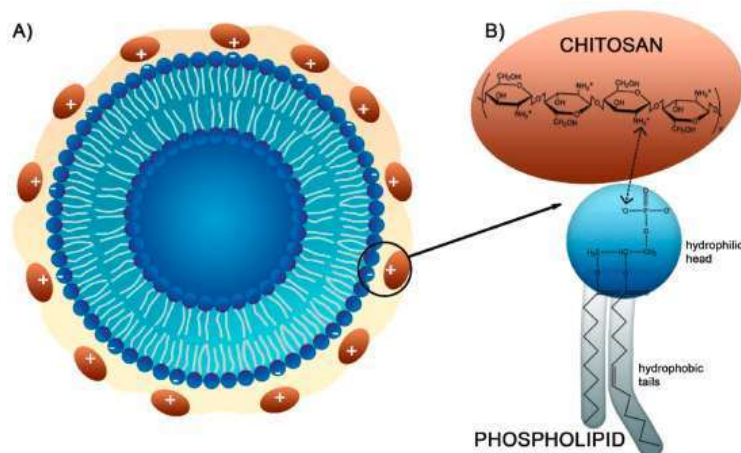
Rojczyk et al. (2020) realizaram uma revisão na literatura sobre a aplicação da própolis na cicatrização de feridas e revelou que, mesmo em diversas formas de administração (pomada, uso tópico e filme), a própolis pode acelerar o processo de cicatrização de feridas e melhorar sua fisiologia devido às propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas.

Pode-se observar, portanto, que os extratos contendo os compostos ativos da própolis podem degradar rapidamente, dependendo das condições ambientais. A encapsulação de compostos bioativos pode melhorar sua biodisponibilidade, estabilidade e ainda proporcionar a liberação controlada do ativo. Nas cápsulas, os compostos ativos são empacotados, e podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

1.2.1. TPP-quitossomas

A Figura 1.2 representa um esquema do sistema de TPP-quitossomas são sistemas híbridos formados por lipossomas recobertos com quitosana produzidas a partir da gelificação iônica com TPP (CADDEO et al., 2016; IIDA et al., 2020).

Figura 1.2. Esquema do sistema TPP-quitossomas.



Fonte: ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 40–48, 1 fev. 2021.

Para compreender a estrutura os TPP-quitossomas, é necessário o entendimento da estrutura dos lipossomas. Elas são vesículas em formato esférico formadas por pelo menos uma bicamada de fosfolipídios que se organizam de forma espontânea ou processos mecânicos, como homogeneizadores ou sonificação, em meio aquoso.

Essas vesículas de bicamadas envolvem a água criando um compartimento aquoso separado. Por apresentar essa estrutura, os lipossomas são usados para encapsular compostos de diferentes polaridades, os polares podem ficar no núcleo dos lipossomas enquanto os apolares terão afinidade com a parte entre as suas camadas. Entretanto, estudos indicaram que os lipossomas podem perder os componentes encapsulados em pH gástrico ou por degradação enzimática (CADDEO et al., 2016; LAYE; MCCLEMENTS; WEISS, 2008). De acordo com a revisão de Esposto et al. (2021), a aplicação de um revestimento composto por quitosana pode corroborar para uma maior estabilidade dos compostos bioativos encapsulados contra condições extremas de pH e temperatura.

A quitosana é um polissacarídeo composto por unidades de glucosamina (poli-(β (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosose) sendo produzida através da desacetilação da quitina, como revisado por Kumar (2000). A quitosana possui propriedades antifúngicas e antibacterianas e por tem caráter catiônico, vem sendo estudada. Sua biodegradabilidade e facilidade em formar filmes causam um grande interesse nas pesquisas (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004; DUTTA et al., 2009; NO et al., 2007; QING et al., 2016; VÁSCONEZ et al., 2009). Devido às suas propriedades, a quitosana possui grupos amino que são protonados em soluções ácidas e podem interagir com a superfície negativamente carregado dos lipossomas, formando os quitossomas. Essa estrutura formada tem sido estudada para melhorar a estabilidade dos lipossomas, aumentando a capacidade de controlar a liberação do ativo encapsulado (2017; ALOMRANI et al., 2019; CADDEO et al., 2016; GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016; MAZLOOMI et al., 2020).

A adição da quitosana pode melhorar a estabilidade dos lipossomas, entretanto, por possuir alta solubilidade em meio ácido, a capacidade de controlar a liberação se torna limitada. Por esse motivo, a adição de um agente de reticulação está sendo estudada (CADDEO et al., 2016; ESPOSTO et al., 2021). A Figura 1.2 mostra um esquema da partícula de TPP-quitossoma. Em azul, pode-se observar as camadas de lipossomas, em pontos na cor marrom, a quitosana carregada positivamente e, em faixa na cor marrom, o TPP como agente de reticulação.

Segundo Koukaras et al. (2012), a reticulação acontece quando o TPP carregado negativamente pelos grupos fosfatos do TPP interagem com os grupos amino protonados da

quitosana. Essa interação resulta no cruzamento dos grupos de cargas opostas, podendo envolver os lipossomas após a reticulação. Diversos estudos utilizam o TPP como agente de reticulação da quitosana formando nanopartículas de quitosana (BRITTO et al., 2014; HOSSEINI et al., 2013; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

A Tabela 1.3 apresenta alguns estudos que avaliaram a liberação de composto ativo em quitossomas e/ou TPP-quitossomas, assim como tamanho de partícula, potencial zeta e eficiência de encapsulação.

Tabela 1.3. Estudos realizados com encapsulação de compostos ativos utilizando quitossomas e TPP-quitossomas.

Referência	Composto ativo	Composição da partícula	EE (%)	Potencial Zeta (mV)	Tamanho (nm)
Caddeo et al., 2016	Quercitina (5mg/mL)	-P90H (60 mg/mL)	91	+2	180
		-P50 (30 mg/mL)			
		-Ch (0,5% m/v)			
		-TPP (0,2% m/v)			
Iida et al., 2020	Colecalciferol (1 mg/mL)	-Ch (2 ou 4 mg/mL)	97	23 a 35	28,2 a 5560
		-TPP (0,6 mg/mL)			
Alomrani et al., 2019	5-fluorouracil (1% m/v)	-Lipoid 90G			
		-Lipoid (0,9 M)	51 a 55	8,3 a 14,7	236 a 271
		-Tween (0,1 M)			
		-Colesterol (0,3 M)			
		Dicetilfosfato (0-0,1% m/v)			
Mazloomi, 2020	Proteína de semente de laranja (10 mg/mL)	-Ch (0,25% m/v)			
		-Lecitina (0,9 g/mL)	80 a 86	26 a 16,5	216 a 138
		-Colesterol (0,1 g/mL)			
		-Tween (0,2 g/mL)			
Gibis, 2016	Extrato de semente de uva (0,1% m/m)	-Ch (0,1 a 0,4% m/v)			
		-Lecitina (1,1% m/m)	99,5	64,9	160
		-Ch (1% m/m)			

Fonte: Própria autoria.

A maior eficiência de encapsulação encontrada foi de 99,5 % de quitossomas de lecitina (1,1% m/m) com quitosana (1% m/m) (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016) sendo seguida pelos sistemas de TPP-quitossomas (colecalfiferol e quercetina, 97% e 91% respectivamente) (CADDEO et al., 2016; IIDA et al., 2020). A menor eficiência foi da partícula de quitossomas carregadas com 5-fluorouracil (55%) (ALOMRANI et al., 2019) (Tabela 1.3).

Quando o tamanho das partículas é avaliado, observa-se que a maior partícula foi o quitossoma de menor eficiência (ALOMRANI et al., 2019) com partículas de até 271 nm e a menor partícula foi o quitossoma com extrato de semente de uva, com 160 nm (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016). As partículas de TPP-quitossomas apresentaram diâmetros dentre os menores, com 180 nm (CADDEO et al., 2016). O tamanho de partículas carregadas com compostos ativos depende de fatores como a afinidade entre a quitosana e as moléculas carregadas e da concentração de composto ativo adicionado (BRITTO et al., 2014; HOSSEINI et al., 2013; KEAWCHAOON; YOKSAN, 2011)

O potencial zeta das partículas citadas na Tabela 1.3 apresentaram valores positivos, visto que a quitosana que reveste os lipossomas (geralmente de potencial zeta próximo de zero ou negativo) mudam a carga superficial para positiva, confirmando que esse revestimento de quitosana foi formado. Observa-se, neste contexto, que o maior potencial zeta (+ 64,9 mV) é da composição com maior teor de quitosana (1% m/m) (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016). Na mesma linha, percebe-se que o menor potencial (+ 2 mV) é do TPP-quitossoma. (CADDEO et al., 2016).

Caddeo et al. (2016) produziram partículas de TPP-quitossomas carregadas com quercetina e o tamanho dessas partículas foram maiores (180 nm) do que as partículas de lipossomas (140 nm). O potencial zeta dos lipossomas foi negativo (~ -30 mV), devido à carga transportada por fosfolipídios, o que colaborou para a ligação com as amins protonadas da quitosana. Os quitossomas apresentaram potencial positivo (+ 46 mV) assim como quando houve a reticulação com TPP (+ 2 mV) entretanto tornou-se mais próximo da neutralidade pela presença dos íons do TPP. Caddeo et al. (2016) também realizaram a liberação de quercetina em pH ácido (1,2) e os TPP-quitossomas mostraram que tal liberação não foi dependente do tempo, atingindo a quantidade máxima após 10 min e sendo constante até 2 h. Entretanto, em pH básico, a liberação foi aumentada e dependente do tempo. Após 2 h, a quantidade de droga liberada foi 2 vezes maior do que em pH 1,2. Foi concluído que o sistema reticulado apresentou vantagens quando comparado com o lipossoma em testes *in vitro*, pois os TPP-quitossomas modulavam a liberação de quercetina em função do pH (preferencialmente alcalino), e

provavelmente era governado pela difusão do fármaco através do sistema, mantendo a estabilidade dos ativos.

Alomrani et al. (2019) também estudaram a liberação de 5-fluorouracil em quitossomas e ao longo de 4 h, os valores foram de 31,4% a 46,5% de ativos liberados. Além disso, a liberação cumulativa foi de 44,6% a 50,1% após 12 h. Ao longo de 4 h, a liberação do medicamento de nanopartículas de quitosana também estudada por Alomrani et al. (2019) foi de 57,5%, e a liberação cumulativa atingiu 73,9% e 87,4% após 12 e 24 h, respectivamente. Esta liberação rápida inicial foi devido à difusão do 5-FU da superfície das nanopartículas, enquanto a liberação lenta foi um efeito dos quitossomas.

Mazloomi et al. (2020) estudaram o efeito do tempo de armazenamento e da temperatura nos lipossomas contendo diferentes concentrações de quitosana carregados com proteína de semente de laranja. Nos lipossomas não revestidos, cerca de 70% das proteínas foram liberadas da estrutura após 28 dias de armazenamento na temperatura de refrigeração. Nas partículas revestidas com 0,2% de quitosana, a taxa de liberação reduziu para 49% após 28 dias de armazenamento a 4 °C, comprovando que a liberação dos compostos ativos encapsulados nos quitossomas é menor quando comparada aos lipossomas.

Os resultados da liberação *in vitro* de polifenóis do extrato de semente de uva (GIBIS; RUEDT; WEISS, 2016) indicaram que todos os sistemas de lipossomas possuíam um mecanismo de liberação controlada e seguiram um modelo cinético de primeira ordem. Analisando o sistema com quitosana, observou-se uma melhora no armazenamento e no processo de estabilidade das partículas.

Os resultados obtidos desses estudos indicam que tanto os quitossomas quanto os TPP-quitossomas têm grande potencial na encapsulação de compostos ativos melhorando sua estabilidade. Há estudos que também demonstraram que a adição de CNs em partículas de quitosana formam uma rede que podem melhorar a estabilidade de compostos ativos encapsulados (AKHLAGHI et al., 2014; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

1.2.2. Nanocristais de celulose

A celulose é um polissacarídeo extremamente farto no meio ambiente, sendo o principal componente da parede das células vegetais. Ela tem chamado a atenção do mercado devido à necessidade de substituição dos materiais sintéticos e pode ser obtida de resíduos agrícolas de diversas fontes lignocelulósicas (KUMARI et al., 2019; MARETT; ANING; FOSTER, 2017;

PRADO; SPINACÉ, 2019; TIBOLLA et al., 2019). A celulose é formada por duas moléculas de glicose ligadas por ligações β -1,4-glicosídicas (DAMODARAN; FENNEMA, 2008).

Na parede celular dos vegetais, é estruturada por microfibrilas compostas de celulose, hemiceluloses e lignina. Esses 3 polímeros sofrem interações físicas e químicas por ligações covalentes que conferem a estrutura da microfibrila. Essas interações são de forma ordenada (cristalina) que se alternam com regiões menos ordenadas (amorfas) (ANSELL; MWAIKAMBO, 2009). Essa estrutura da celulose lhe proporciona grande resistência à tração e insolubilidade na maioria dos solventes. As suas propriedades mecânicas e químicas trazem um grande interesse nas pesquisas além de ser um polímero natural e biodegradável. A partir de tratamentos químicos e enzimáticos, pode-se desfibrilar a celulose, produzindo fibras de diâmetro nanométrico. Dependendo do tratamento, pode-se obter nanofibrilas (hidrólise enzimática e/ou fragmentação mecânica, com comprimento micrométrico) ou nanocristais de celulose (CNs) (hidrólise ácida e fragmentação mecânica, com comprimentos menores que 1 μ m).

A produção de suspensões de CNs podem ser preparadas a partir de diversas fontes vegetais (KARGARZADEH et al., 2017b). A palha de soja muito abundante no Brasil é uma fonte de celulose, tendo em vista que sua composição se compreende como: 35% de celulose, 21% lignina insolúvel em ácido, 17% de hemiceluloses, 11% de cinzas, 1% lignina solúvel e outros constituintes como proteínas, pectina e substitutos do ácido glucurônico (CABRERA et al., 2015; MARTELLI-TOSI et al., 2017; WAN; ZHOU; LI, 2011), mas que podem variar de acordo com o genótipo da planta (ALEMDAR; SAIN, 2008).

As CNs podem ser produzidas a partir de três etapas: (1) tratamento químico básico, (2) hidrólise ácida (ALEMDAR; SAIN, 2008; CHEN et al., 2009; MORÁN et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2011) e (3) fragmentação mecânica.

O pré-tratamento é necessário para propiciar maior acesso à celulose, aumentando a área superficial e a porosidade. Nessa etapa, comumente chamada de mercerização, utiliza-se uma base forte que hidrolisa as hemiceluloses e altera a estrutura da lignina aumentando sua solubilidade e auxiliando sua remoção (DHALI et al., 2021). Ainda dentro do pré-tratamento, é feito o clareamento (ou deslignificação) para hidrolisar parcialmente a lignina utilizando compostos clorados ou peróxido de hidrogênio (MARTELLI-TOSI et al., 2017, 2018; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

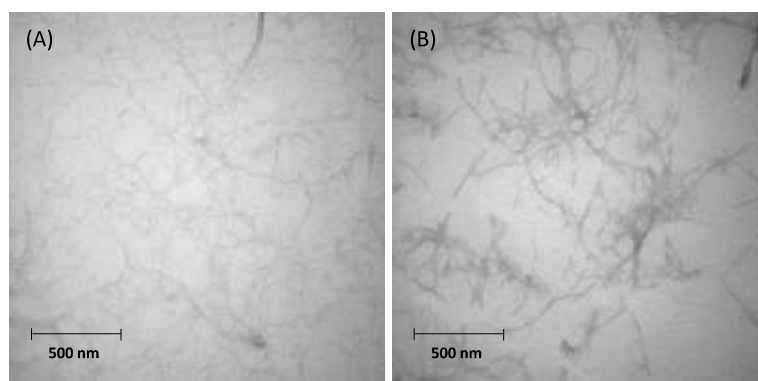
A segunda etapa consiste na hidrólise da celulose com ácidos fortes (MARETT; ANING; FOSTER, 2017; MARTELLI-TOSI et al., 2018; PRADO; SPINACÉ, 2019). Este

processo de hidrólise age nas estruturas amorfas e hidrolisa parcialmente a celulose, entretanto as regiões cristalinas permanecem intactas, formando CNs em forma de bastões.

A terceira etapa consiste na homogeneização para desfibrilamento, utilizando energia do ultraturrax e/ou ultrassom ou microfluidizador. A dispersão se estabiliza e evita que haja aglomeração das CNs (MARETT; ANING; FOSTER, 2017).

Estudos recentes mostraram que a utilização de outros métodos químicos utilizando agentes deslignificantes não clorados, como o ácido peracético e o peróxido de hidrogênio foram também eficazes na produção de CN (espessura: de 14 a 37 nm e comprimento: de 833 a 2640 nm) com alto teor de cristalinidade (entre 57 e 70%) e, quando incorporadas em filmes à base de amido, melhoraram suas propriedades mecânicas, de permeabilidade ao vapor de água e de solubilidade (ANDRADE-MAHECHA et al., 2015). Nesse estudo, utilizou-se também a etapa de tratamento mecânico a alta pressão, ressaltando a importância do grau de interação entre as CNs e a matriz polimérica na melhoria das propriedades do filme. Atualmente, nosso grupo de pesquisa têm trabalhado na produção de CNs a partir de palha da soja mercerizada por hidrólise enzimática ou química (MARTELLI-TOSI et al., 2017, 2018), como pode ser observado nas Figura 1.3A e B, respectivamente.

Figura 1.3. Micrografias de nanocelulose obtidas a partir da palha de soja mercerizada por hidrólise (A) enzimática ou (B) ácida



Fonte: MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61-68, 2018.

Os grupos hidroxilas (OH) da superfície de CN podem formar ligações de hidrogênio assim como também podem interagir com moléculas carregadas positivamente, visto que possui grupos OSO_3^- .

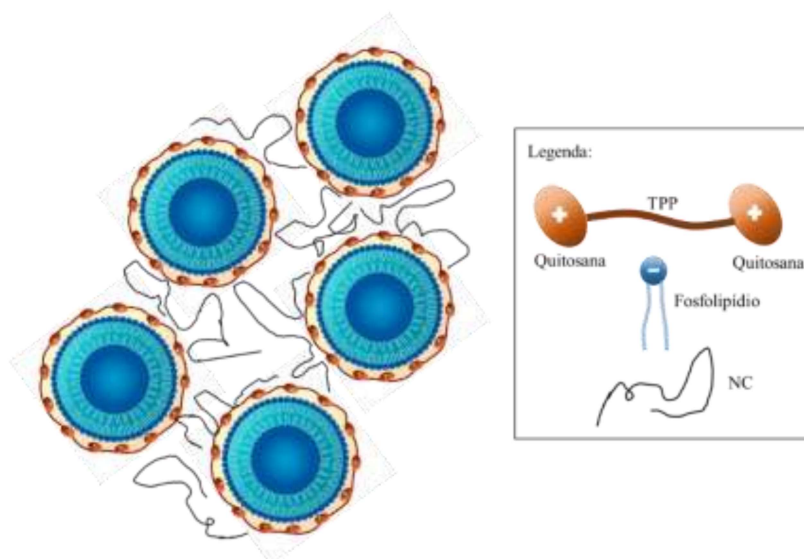
Portanto, os CNs obtidos por hidrólise química foram escolhidos para o estudo, devido à sua maior área de superfície e aos grupos OSO_3^- que denotam seu caráter aniônico. Considerando essas propriedades, espera-se que a interação com o TPP-quitossomas seja mais favorecida, em comparação com as nanoceluloses obtidas por processos enzimáticos.

Até o presente momento não foram encontrados estudos de incorporação de CNs no sistema TPP-quitossomas, mas, avaliando os trabalhos existentes, é possível elucidar uma estrutura que poderá se formar (Figura 1.4). Os grupos hidroxilas (OH) na estrutura da celulose favorecem a ligação de hidrogênio intermolecular entre CNs e espécies polares ou não ionizadas e, conseqüentemente, a formação de sistemas híbridos com polímeros catiônicos como a quitosana (AKHLAGHI et al., 2014; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Desta forma, podemos observar na Figura 1.4, a possível formação de uma rede entre as partículas de TPP-quitossomas através das CNs representadas como linhas pretas.

De acordo com Okamoto-Schalch et al. (2020), a inserção de CNs em suspensão de nanopartículas interferiu na aglutinação iônica, formando aglomerados com delineamentos irregulares, sugerindo que ambos polímeros tendem a interagir física ou quimicamente.

Considerando os trabalhos realizados com sistemas híbridos de CNs, espera-se que essa estrutura seja eficaz na estabilização e liberação *in vitro* dos compostos ativos encapsulados (AKHLAGHI et al., 2014; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

Figura 1.4. Esquema da estrutura do sistema híbrido de TPP-quitossomas com CNs.



Fonte: Esquema adaptado de ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 40–48, 1 fev. 2021

1.3. Criogéis

Os géis secos são normalmente produzidos a partir da síntese sol-gel. Sol é definido como uma dispersão coloidal com partículas de 1-1000 nm (fase dispersa) dispersas em um líquido (meio de dispersão) e é o termo usado para distinguir as dispersões coloidais das suspensões macroscópicas (SHAW, 2013). Já o termo gel pode ser definido como uma rede tridimensional de cadeia polimérica (meio de dispersão), onde todo o solvente fica preso mecanicamente nos poros (fase dispersa), assumindo uma aparência sólida (SHAW, 2013). Os hidrogéis são géis com fase dispersa sendo água. Assim, na etapa de síntese, uma reação de reticulação ocorre e os géis secos são então produzidos em três etapas (GOMEZ, 2019):

- Transição solução-sol: as partículas de sol são formadas na solução precursora por meio de reações de hidrólise e de condensação;

- Transição sol-gel (gelificação): as partículas do sol são reticuladas, química ou fisicamente, formando uma rede tridimensional contínua;

- Transição gel-aerogel (secagem): o solvente no interior do gel úmido é repelido pelo ar, sem danos graves à sua estrutura.

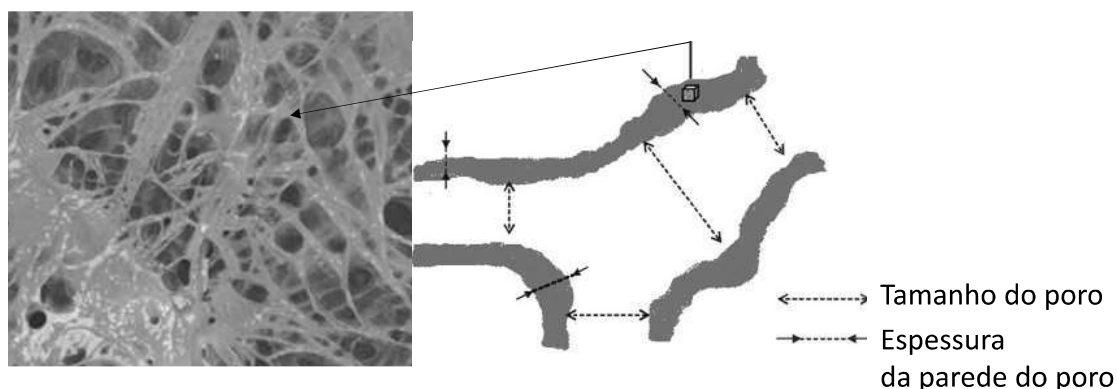
Portanto, os géis secos podem ser obtidos a partir de diferentes técnicas de secagem, diferindo em relação à estrutura porosa e, conseqüentemente, às propriedades mecânicas e de permeabilidade. Quando o solvente é evaporado pela técnica de secagem supercrítica, normalmente resulta em aerogéis, sofrendo pouco impacto na estrutura do material, formando uma estrutura porosa e com pouca retração. Quando se utiliza a técnica de secagem lenta, as tensões capilares causam uma retração irreversível do gel e um colapso de seus poros, resultando em xerogéis. Ao se aplicar a técnica de liofilização, a estrutura também sofre alterações à medida que o crescimento dos cristais do solvente (usualmente água) leva à fragmentação das amostras, característica comum dos criogéis (VAREDA; LAMY-MENDES; DURÃES, 2018). De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), aerogel é definido como um "composto de um gel sólido microporoso em que a fase dispersa é um gás". A porosidade dos géis secos a base de celulose ou quitosana podem variar de 70-80% para xerogéis, até 90-96% para aerogéis e criogéis (GANESAN et al., 2016; ZHANG et al., 2019). Portanto, criogéis com alta porosidade também podem ser definidos como aerogéis, e alguns trabalhos publicados os definem assim (KANG et al., 2016; MENG et al., 2015; PEI; ZHAI; ZHENG, 2015).

De acordo com Vareda, Lamy-Mendes e Durães (2018), alguns criogéis apresentaram propriedades semelhantes às de aerogéis. Eles analisaram trabalhos que produziram monólitos via liofilização e verificaram que alguns materiais obtidos apresentaram áreas de superfície muito altas, como aerogel. Os materiais tinham baixas densidades e alguns foram mais leves do que os aerogéis.

Os atributos físicos e químicos dos criogéis, como macroporosidade, elasticidade, permeabilidade à água e facilidade de modificação química, têm atraído forte interesse de pesquisa em uma variedade de áreas, como purificação de água (remoção de metais pesados) (BAIMENOV et al., 2020), adsorventes (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2021), medicina regenerativa (CHEN et al., 2021; ESKANDARINIA et al., 2020), biotecnologia (PLIEVA et al., 2008), biossensores (FATONI et al., 2013), dentre outras.

O tamanho dos poros nos criogéis variam de escala submicrométrica para algumas dezenas de micrômetros, dependendo das condições de produção, como a natureza do polímero, solvente, tipo de reticulante, concentrações e razões de temperatura e taxa de congelamento (GARCÍA et al., 2010; SHIEKH et al., 2021; TSUJIMURA et al., 2010). As suas propriedades dependem de sua estrutura de poro (tamanho de poro, distribuição de tamanho de poro e interconectividade), a espessura da parede dos poros e a densidade expressa como a concentração de polímero nas paredes dos poros dilatados (Figura 1.5) (MIKHALOVSKY et al., 2011).

Figura 1.5. Esquema dos parâmetros que influenciam o desempenho dos hidrogéis porosos.



Fonte: OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Nanocellulose hybrid systems: carriers of active compounds and aerogel/cryogel applications. In: ORAON, R. et al. (Eds.). **Nanocellulose Materials: Fabrication and industrial Applications**. U.K.: Elsevier Ltd, 2022. p. 330. (micrografia) e esquema adaptado de Medical Biotechnology and Healthcar.

Os criogéis PVA termorreversíveis produzidos sem um reticulador têm o tamanho de poro entre 100 nm e 1 μ m, enquanto os criogéis PVA reticulados quimicamente têm poros grandes de 1 μ m a 150 μ m. Macroporos deste tamanho também foram apelidados de supermacroporos por alguns autores. Os criogéis supermacroporosos são geralmente materiais esponjosos com estrutura de poros interconectados.

Os criogéis são versáteis, pois a crioestruturação pode ser utilizada para projetar e criar estruturas com propriedades ajustáveis com uma estrutura porosa interconectada grande e contínua. Eles têm sido estudados como matrizes alternativas para aplicações biomédicas, pois apresentam características marcantes como a grande quantidade de poros e de dimensões amplas, grande área de superfície o tornando um material com alta capacidade de absorção. A adaptação de tais propriedades é baseada principalmente no tipo e concentração de polímero / monômero, concentração de reticulador, temperatura de congelamento e controle da forma de congelamento (SHIEKH; SINGH; KUMAR, 2020).

Os criogéis tem alta capacidade de absorção de água, retendo líquidos e evitando o acúmulo em feridas (WANG et al., 2013), por esse motivo as estruturas de biomaterial na forma de hidrogel podem facilitar o processo de tratamento da ferida. Os macroporos interconectados dos criogéis e as propriedades autocurativas dos hidrogéis permitem a penetração celular e facilitam a troca de nutrientes e metabólitos para a reparação do tecido (CHEN et al., 2021). Alguns estudos de mecanismos para a melhora da cicatrização estão apresentados Tabela 1.4. Esses estudos encontraram resultados promissores na cicatrização de feridas com o uso de criogéis ou *scaffolds* (estruturas 3D porosas) carregados com composto ativo. Eskandarinia et al. (2020) estudaram a cicatrização das feridas em camundongos utilizando curativos de poliuretano-extrato de própolis e também um curativo bicamada com gelatina-policaprolactona. O grupo com curativo de uma camada exibiu maior taxa de fechamento da ferida em comparação com o controle em 15 dias. O grupo tratado com curativo bicamada apresentou aproximadamente feridas curadas e fechadas neste período.

As feridas, principalmente em diabéticos, apresentam características patológicas e a principal estratégia de cicatrização é reduzir a resposta inflamatória (WANG et al., 2020b). Portanto, o composto ativo estudado neste trabalho, o extrato de própolis vermelha, que tem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimicrobianas, é um ativo que pode ser inserido em um sistema onde a liberação controlada irá contribuir para o uso dos criogéis no tratamento das feridas.

Tabela 1.4. Estudos realizados com géis secos para melhorar na cicatrização de feridas

Referência	Composto ativo	Sistema	Resultados relevantes
Wang et al. (2020b)	Curcumina	<i>scalfford</i>	Podem promover a cicatrização de feridas cutâneas em camundongos diabéticos.
Zhang et al. (2016)	5-Fluorouracil	Criogel + celulose	Microesferas termossensíveis, dispositivo de liberação controlada
Eskandarinia et al. (2020)	Própolis	<i>scalfford</i>	Biocompatível, biodegradável e propriedades mecânicas adequadas. Atividade antibacteriana contra bactérias comuns de infecção de feridas. Pode acelerar a progressão da cicatrização e encurtar o tempo de fechamento da ferida em animais.
Chen et al. (2021)	Células tronco	Criogel + acupuntura	Aumentou a temperatura superficial e favoreceu a regeneração
Bölgen et al. (2020)	Óleo de Hypericum perforatum	Criogel	Alta capacidade de inchamento com um perfil de degradação lento. Excelentes efeitos antimicrobianos contra <i>E. coli</i> e <i>L. pneumophila</i>
Shiekh, Singh e Kumar (2020)	Oxigênio	Criogel	Liberau oxigênio atenuando o estresse oxidativo, induziu a vascularização e aumentou a remodelação do colágeno.

Fonte: Própria autoria.

REFERÊNCIAS

- AKHLAGHI, S. P. et al. Comparative release studies of two cationic model drugs from different cellulose nanocrystal derivatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 207–215, 1 set. 2014.
- ALAVI, M.; KARIMI, N.; SAFAEI, M. Application of Various Types of Liposomes in Drug Delivery Systems. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 1, p. 3–9, 13 abr. 2017.
- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, 1 abr. 2008.
- ALOMRANI, A. et al. The use of chitosan-coated flexible liposomes as a remarkable carrier to enhance the antitumor efficacy of 5-fluorouracil against colorectal cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 27, n. 5, p. 603–611, 2019.
- ANDRADE-MAHECHA, M. M. et al. Achira as a source of biodegradable materials: Isolation and characterization of nanofibers. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 406–415, 5 jun. 2015.
- ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, n. September, p. 129–138, 2017.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANSELL, M. P.; MWAIKAMBO, L. Y. The structure of cotton and other plant fibres. **Handbook of Textile Fibre Structure**, p. 62–94, 1 jan. 2009.
- BAIMENOV, A. et al. A review of cryogels synthesis, characterization and applications on the removal of heavy metals from aqueous solutions. **Advances in Colloid and Interface Science**. Elsevier B.V., , 1 fev. 2020.
- BARCELOUX, D. G. et al. American Academy of Clinical Toxicology Practice Guidelines on the Treatment of Methanol Poisoning. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 40, n. 4, p. 415–446, 23 jan. 2002.
- BÖLGEN, N. et al. Development of Hypericum perforatum oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1581–1590, 15 out. 2020.
- BRASIL. Regulamento técnico de identidade e qualidade, 2001.
- BRITTO, D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 22, n. 12, p. 1261–1267, 2014.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 347–363, 1998.

- CABRERA, E. et al. Comparison of industrially viable pretreatments to enhance soybean straw biodegradability. **Bioresource Technology**, v. 194, p. 1–6, 1 out. 2015.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69–78, 2016.
- CASTRO, C. et al. Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis. **Food Research International**, v. 64, p. 873–879, 1 out. 2014.
- CHEN, T. Y. et al. Cryogel/hydrogel biomaterials and acupuncture combined to promote diabetic skin wound healing through immunomodulation. **Biomaterials**, v. 269, n. 161, p. 120608, 2021.
- CHEN, Y. et al. Pea starch-based composite films with pea hull fibers and pea hull fiber-derived nanowhisker. **Polymer Engineering and Science**, p. 360–378, 2009.
- CORRÊA, F. R. S. et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation-associated transcription factor NFκB. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 86, p. 162–171, 1 fev. 2017.
- DALPONTE DALLABONA, I. et al. Development of alginate beads with encapsulated jabuticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1421–1432, 2020.
- DAMODARAN, S.; FENNEMA, K. L. **Fennema's Food Chemistry**. New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008.
- DEVLIEGHIERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 703–714, 1 dez. 2004.
- DHALI, K. et al. A review of nanocellulose as a new material towards environmental sustainability. **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145871, 25 fev. 2021.
- DUTTA, P. K. et al. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**, v. 114, n. 4, p. 1173–1182, 15 jun. 2009.
- EBADI, P.; FAZELI, M. Evaluation of the potential in vitro effects of propolis and honey on wound healing in human dermal fibroblast cells. **South African Journal of Botany**, v. 137, p. 414–422, 1 mar. 2021.
- ESKANDARINIA, A. et al. A propolis enriched polyurethane-hyaluronic acid nanofibrous wound dressing with remarkable antibacterial and wound healing activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 149, p. 467–476, 15 abr. 2020.
- ESPOSTO, B. S. et al. Liposomes vs. chitosomes: Encapsulating food bioactives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 108, p. 40–48, 1 fev. 2021.
- FATONI, A. et al. A highly stable oxygen-independent glucose biosensor based on a chitosan-albumin cryogel incorporated with carbon nanotubes and ferrocene. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 185, p. 725–734, 1 ago. 2013.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. DE. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.

GANESAN, K. et al. Design of aerogels, cryogels and xerogels of cellulose with hierarchical porous structures. **Materials and Design**, v. 92, p. 345–355, 15 fev. 2016.

GARCÍA-GONZÁLEZ, A. et al. Experimental and theoretical study of dyes adsorption process on chitosan-based cryogel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 75–84, 1 fev. 2021.

GARCÍA, B. B. et al. Hexamethylenetetramine multiple catalysis as a porosity and pore size modifier in carbon cryogels. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 356, n. 33–34, p. 1620–1625, 15 jul. 2010.

GIBIS, M.; RUEDT, C.; WEISS, J. In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. **Food Research International**, v. 88, p. 105–113, 1 out. 2016.

GOMEZ, M. E. V. Desenvolvimento de aerogéis baseados em amidos para a impregnação de óleo de café verde. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2019.

HOCHHEIM, S. et al. Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350, 2019.

HOSSEINI, S. F. et al. Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro release study. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 50–56, 2013.

IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polimeros**, v. 29, n. 4, p. 1–8, 2020.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 755–766, 1995.

KANG, J. et al. Fabrication and characterization of poly(3-hydroxybutyrate) gels using non-solvent-induced phase separation. **Polymer**, v. 104, p. 61–71, 2016.

KARGARZADEH, H. et al. Recent developments on nanocellulose reinforced polymer nanocomposites: A review. **Polymer**, v. 132, p. 368–393, 6 dez. 2017.

KEAWCHAOON, L.; YOKSAN, R. Preparation, characterization and in vitro release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 84, n. 1, p. 163–171, 2011.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1–27, 2000.

KUMARI, P. et al. Cellulose nanofibers from lignocellulosic biomass of lemongrass using enzymatic hydrolysis: characterization and cytotoxicity assessment. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 2, p. 683–693, 25 dez. 2019.

LAYE, C.; MCCLEMENTS, D. J.; WEISS, J. Formation of biopolymer-coated liposomes by electrostatic deposition of chitosan. **Journal of Food Science**, v. 73, n. 5, 2008.

MARETT, J.; ANING, A.; FOSTER, E. J. The isolation of cellulose nanocrystals from pistachio shells via acid hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 869–874, 15 dez. 2017.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al. Development, characterization and pre-clinical trials of an innovative wound healing dressing based on propolis (EPP-AF®)-containing self-microemulsifying formulation incorporated in biocellulose membranes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 570–578, 2019.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 512–520, fev. 2017.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61–68, out. 2018.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns & Trauma**, v. 3, p. 1–7, 2015.

MAZLOOMI, S. N. et al. Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate. **Journal of Food Engineering**, v. 280, n. February, p. 109976, 2020.

MENG, J. et al. Facile Fabrication of 3D SiO₂@Graphene Aerogel Composites as Anode Material for Lithium Ion Batteries. **Electrochimica Acta**, v. 176, p. 1001–1009, 2015.

MIKHALOVSKY, S. V. et al. Biomaterials/Cryogels. **Comprehensive Biotechnology (Second Edition)**, Academic Press, Elsevier B.V., 2011. v. 5

MORÁN, J. I. et al. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. **Cellulose**, v. 15, n. 1, p. 149–159, 2008.

NO, H. K. et al. Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, 2007.

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Production and characterization of chitosan-TPP/cellulose nanocrystal system for encapsulation: a case study using folic acid as active compound. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5855–5869, 2020.

PARK, Y. K. et al. ESTUDO DA PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS E SUAS APLICAÇÕES. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 3, p. 313–318, ago. 1998.

PEI, X.; ZHAI, W.; ZHENG, W. Preparation of poly(aryl ether ketone ketone)–silica composite aerogel for thermal insulation application. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 76, n. 1, p. 98–109, 2015.

PLIEVA, F. M. et al. Cryogel applications in microbiology. **Trends in Microbiology**, Elsevier Current Trends, , 1 nov. 2008.

PRADO, K. S.; SPINACÉ, M. A. S. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from pineapple crown waste and their potential uses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 410–416, 1 fev. 2019.

QING, W. et al. The modified nanocrystalline cellulose for hydrophobic drug delivery. **Applied Surface Science**, v. 366, p. 404–409, 15 mar. 2016.

RAMAWAT, K. G.; MÉRILLON, J. M. Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. [s.l: s.n.].

REFAAT, H. et al. Optimization and evaluation of propolis liposomes as a promising therapeutic approach for COVID-19. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 592, n. November 2020, p. 120028, 2021.

REVILLA, I. et al. The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant, color and bactericide characteristics of raw propolis. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 211–217, 2017.

REYES, L. M.; LANDGRAF, M.; SOBRAL, P. J. A. Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, n. June 2020, p. 100607, 2021.

ROJCZYK, E. et al. Historical and modern research on propolis and its application in wound healing and other fields of medicine and contributions by Polish studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 17, 15 nov. 2020.

SHAW, D. J. Introduction to colloid and surface chemistry. 4. ed. Reino Unido: Butterworth-Heinemann, 2013.

SHIEKH, P. A. et al. Designing cryogels through cryostructuring of polymeric matrices for biomedical applications. **European Polymer Journal**, Elsevier Ltd, , 5 fev. 2021.

SHIEKH, P. A.; SINGH, A.; KUMAR, A. Exosome laden oxygen releasing antioxidant and antibacterial cryogel wound dressing OxOBand alleviate diabetic and infectious wound healing. **Biomaterials**, v. 249, p. 120020, 1 ago. 2020.

SWAIN, T.; HILLIS, W. The Phenolic constituents of prunus domestica. **Science of Food and Agriculture**, v. 10, n. 1, p. 63–68, 1959.

TEIXEIRA, E. DE M. et al. Sugarcane bagasse whiskers: Extraction and characterizations. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 1, p. 63–66, 1 jan. 2011.

TIBOLLA, H. et al. Banana starch nanocomposite with cellulose nanofibers isolated from banana peel by enzymatic treatment: In vitro cytotoxicity assessment. **Carbohydrate Polymers**, v. 207, p. 169–179, 1 mar. 2019.

TSUJIMURA, S. et al. Electrochemical reaction of fructose dehydrogenase on carbon cryogel electrodes with controlled pore sizes. **Electrochemistry Communications**, v. 12, n. 3, p. 446–449, 1 mar. 2010.

VAREDA, J. P.; LAMY-MENDES, A.; DURÃES, L. A reconsideration on the definition of the term aerogel based on current drying trends. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 258, p. 211–216, 2018.

VÁSCONEZ, M. B. et al. Antimicrobial activity and physical properties of chitosan–tapioca starch based edible films and coatings. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 762–769, 1 ago. 2009.

WAN, C.; ZHOU, Y.; LI, Y. Liquid hot water and alkaline pretreatment of soybean straw for improving cellulose digestibility. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6254–6259, 1 maio 2011.

WANG, H. M. et al. Novel Biodegradable Porous Scaffold Applied to Skin Regeneration. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–11, 2013.

WANG, T. C. et al. Establishment of a propolis ethanolic extract self-microemulsifying drug delivery system and its antibacterial activity. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, n. li, p. 1–7, 2021.

WANG, Y. et al. Hierarchical micro/nanofibrous scaffolds incorporated with curcumin and zinc ion eutectic metal organic frameworks for enhanced diabetic wound healing via anti-oxidant and anti-inflammatory activities. **Chemical Engineering Journal**, v. 402, p. 126273, 15 dez. 2020.

ZHANG, F. et al. Temperature-sensitive poly-NIPAm modified cellulose nanofibril cryogel microspheres for controlled drug release. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 415–425, 2016.

ZHANG, H. et al. Control of ice crystal growth and its effect on porous structure of chitosan cryogels. **Chemical Engineering Science**, v. 201, p. 50–57, 29 jun. 2019.

**CAPÍTULO 2 . EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
ATIVOS DA PRÓPOLIS VERMELHA**

2.1. Introdução

Os compostos ativos da própolis variam de acordo com a origem geográfica e botânica, estação do ano, genética das abelhas e fatores ambientais. O aproveitamento da própolis para produção de extratos já é realizado comercialmente, devido às suas propriedades antioxidantes, no entanto, os métodos tradicionais demanda de longo tempo, em torno de 15 dias (DE CAMPOS; ASSIS; BERNARDES FILHO, 2021). Alguns pesquisadores utilizam metanol como solvente, porém a utilização de solução hidroetalólica tem um impacto ambiental menor e o problema de toxicidade é menos evidente no produto final (HOCHHEIM et al., 2019; REVILLA et al., 2017).

Os métodos de extração da própolis podem influenciar suas propriedades, tendo em vista que diferentes solventes solubilizam e extraem diferentes compostos. Algumas pesquisas utilizam técnicas diferenciadas para a extração da própolis, como o banho de ultrassom, entretanto o tempo para esse processo ainda se mostrou longo (ANDRADE et al., 2017; REVILLA et al., 2017).

De acordo com Khandare et al. (2021), a velocidade de agitação também é um fator importante na extração, visto que intensifica a transferência dos ativos para o solvente. As ondas ultrassônicas de alta intensidade auxiliam na penetração do solvente nas partículas que aceleram a transferência e, portanto, a eficiência de extração.

Estudo da análise do extrato de própolis vermelha identificou diversos compostos com atividades biológicas importantes. Foi possível encontrar compostos normalmente encontrados na própolis vermelha brasileira, como vestitol, medicarpina, elemicina e guaiacol (RUFATTO et al., 2018).

De acordo com Bankova et al. (2021), as misturas água-etanol são as mais utilizadas e processos de extração assistida por ultrassom tem resultados promissores, nos quesitos de tempo de extração, rendimento da extração e relação custo-benefício. Bankova et al. (2021) indica mais estudos para encontrar a melhor forma de extrair compostos bioativos da própolis.

Este capítulo teve como objetivo a obtenção de extratos de própolis vermelha utilizando solução hidroetanólica e com o emprego de ultrassom de ponteira.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material

A própolis vermelha foi obtida com apicultores na cidade de Maceió – Alagoas (Br) (9°40'S, 35°41'O), lote 2020, com teor de 5 ± 1 % de umidade. O etanol (99,5%) usado foi adquirido da Êxodo Científica (SP, Brasil).

2.2.2. Extração e quantificação de compostos ativos

Os ensaios preliminares de extração de compostos ativos foram realizados conforme metodologia descrita por Nori et al. (2011) com algumas adaptações. Para cada 2 g de própolis vermelha picada foi adicionado 20 mL de etanol 99,5 %. As amostras foram sonicadas por 10 e 30 min, contínuo e amplitude de 70 % em ultrassom de ponteira de 550 W de potência (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA). Esse procedimento foi realizado com banho de gelo para que as amostras não ultrapassem a temperatura de 50 °C. O volume final foi suspenso para 20 mL e então centrifugado à 4500 rcf, 10 min e 25 °C (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi separado, identificado como extrato de própolis, e armazenado na geladeira (8 °C) ao abrigo de luz.

Após os testes, ficou definido que os extratos seriam obtidos conforme metodologia descrita por Nori et al. (2011) com algumas alterações, com o auxílio de ultrassom de ponta e utilizando como solvente uma solução de hidroetanólica. Foi considerado a necessidade de analisar a concentração de própolis pois afeta o extrato de própolis (PE) no que diz respeito à concentração de compostos fenólicos totais (CFT) e flavonoides.

Como definido anteriormente, a própolis vermelha foi sonicada por 10 min, contínuo e amplitude de 70 % em ultrassom de ponteira de 550 W de potência (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, EUA), sendo a concentração do etanol de 84,5% na solução aquosa e a concentração de própolis de 12,20, 17,50 e 25,00 g / 100 mL de solvente. Esse procedimento foi realizado com banho de gelo para que as amostras não ultrapassem a temperatura de 50 °C. O volume final foi centrifugado à 4500 rcf, 10 min e 25 °C (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O sobrenadante foi separado e armazenado em freezer (-18 °C) ao abrigo da luz.

2.2.2.1. Compostos fenólicos

A quantificação de CFTs foi realizada conforme a metodologia descrita por Swain e Hellis (1959) e Woisky e Salatino (1998), que consiste na utilização da espectroscopia UV-Vis. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada à 2,5 mL de solução Folin – Ciocalteu (10 % v/v). A amostra foi deixada em repouso por 5 min para então adicionar 2,0 mL de solução Na_2CO_3 (4 % m/v). Após 45 min, foi medida a absorbância no comprimento de onda 760 nm (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). O teor de CFTs foi determinado de acordo com a curva padrão do ácido gálico (0 a 0,008 mg/mL): $y = 125,44x + 0,0266$ ($R^2 = 0,9974$). Os resultados estão expressos em mg de equivalente de ácido gálico (GA) por mL de extrato.

2.2.2.2. Flavonoides

A quantificação de flavonoides dos extratos de própolis vermelha foi realizada de acordo com Jurd e Geissman (1956), Dowd (1959) e Kasprzak et al. (2015). Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada à 4,3 mL de solução de etanol (80% v/v), 0,1 mL de nitrato de alumínio nono hidratado (10% m/v) e 0,1 mL de acetato de potássio (1M). Foi deixada em repouso por 40 min à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. A leitura da absorbância foi realizada à 420 nm no espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). O teor de flavonoides foi determinado de acordo com a curva padrão de quercitina (0 a 0,009 mg/mL): $y = 73,292x - 0,0073$ ($R^2 = 0,9967$). Os resultados foram expressos como mg de quer por mL de extrato.

2.2.2.3. Atividade antioxidantes

A capacidade antioxidante (AA) do extrato de própolis vermelha foi realizada pelo método de atividade inibitória do radical livre 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) -6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}) e pelo método do poder antioxidante de redução de ferro – *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP)

A determinação por ABTS^{•+} foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Re et al. (1999). A solução de ABTS^{•+} foi preparada com a adição de ABTS (7 mM) e persulfato de potássio (2,45 mM) diluídos em água e deixado em repouso por 16 h. Após o repouso, foi adicionado etanol absoluto à solução ABTS^{•+} até leitura da absorbância entre 0,65 e 0,75 em

734 nm no espectrofotômetro UV-Vis (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Para realizar a leitura das amostras, a amostra e a solução foram misturadas na proporção de 10 de amostra :1 ABTS⁺⁺, para então repousar por 6 min para cada amostra e leitura em 734 nm. A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com a curva padrão de Trolox (6 a 1955 µM): $y = -0,0422x + 0,7261$ ($R^2 = 0,9984$). Os resultados da curva foram expressos em µM Trolox.

A determinação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi realizado de acordo com a metodologia utilizada por Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). Foi adicionada à 90 µL de amostras, 270 µL de água e 2,7 mL de FRAP. Ficaram em repouso por 30 min à 37 °C para então as absorbâncias serem medidas em 595 nm. A capacidade antioxidante foi determinada de acordo com a curva padrão FeSO₄.7H₂O (0,006 a 0,033 mM): $y = 30,915x - 0,0063$ ($R^2 = 0,9988$). Os resultados foram expressos como mM FeSO₄.

2.2.3. Análise estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e estão apresentados como média ± desvio padrão. Os resultados das variáveis dependentes (CFT, flavonoides, ABTS e FRAP) foram obtidos por análise de variância (ANOVA) e testes de Tukey com nível de significância de 5% utilizando o software Statistica 7.0.

2.3. Resultados e discussão

Inicialmente, foi realizado um teste preliminar de produção de extrato de própolis vermelho para quantificação de CFTs após os tempos de ultrassom de 10 min ou 30 min. Os resultados estão apresentados na Tabela 2.1. Pode ser observado que a amostra que foi retirada após 30 min de extração no ultrassom de ponteira apresentou uma quantidade de CFT menor que o observado em 10 min de extração. Isso pode ter ocorrido devido ao aquecimento das amostras e degradação dos compostos ativos, mesmo sendo utilizado o banho de gelo durante o processo de ultrassom.

O teor de CFTs obtido neste estudo (286 ± 13 mg de GA/g de própolis) foi maior do que os teores de CFTs presentes na própolis vermelha brasileira relatados na literatura, que variaram de 55 a 233 mg GA/g de própolis (ANDRADE et al., 2017; REYES; LANDGRAF; SOBRAL, 2021). Estes valores são principalmente devido à presença dos isoflavonoides

(vestitol e methylvestitol) (RIGHI et al., 2011) e as diferenças dependem do meio de extração e do tipo de processo utilizado.

Tabela 2.1. Resultados preliminares obtidos da quantificação de CFTs do PE obtido em ultrassom de ponteira.

Tempo de extração (min)	Compostos Fenólicos Totais (CFT) (mg de GA/g de própolis)
10	286 ± 13 ^a
30	190 ± 33 ^b

Nessa tabela: Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). Valores identificados com letras iguais não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

Méndez (2017) quantificou os CFTs do extrato de própolis e obteve melhor resultado na extração realizada com etanol 96% a 25 °C por 30 min em agitação mecânica (201,12 ± 2,91 mg de GA/g de extrato). Esses valores foram semelhantes aos encontrados por Reyes et al. (2021). Neste último estudo, foram utilizadas 20 g de própolis em 30 mL de etanol absoluto por 48 h a 25 °C, sob agitação magnética, e foi obtido um valor de 233,3 mg GA/g de própolis.

Quando a extração ocorre em banho de ultrassom, os conteúdos de CFT foram semelhantes. Oroian et al. (2020) obtiveram como resultado 228,63 mg de GA/ g própolis nas condições de 100% de amplitude, etanol 70%, 58 °C por 30 min. Os autores identificaram que a concentração de etanol teve um grande impacto na extração, porém, os parâmetros temperatura e tempo não tiveram a mesma influência na extração que a amplitude do ultrassom (20, 60 e 100%) e a concentração de etanol (40, 60 e 80%).

Assim, foi fixado o tempo de 10 min de ultrassom de ponteira e os resultados estão apresentados na Tabela 2.2 mostra os resultados da concentração de Compostos Fenólicos Totais (CFT, mg GA/mL de PE), flavonoides (mg quercetina/mL de PE) e atividades antioxidantes (ABTS e FRAP) obtidos neste estudo.

Tabela 2.2. Valores de compostos fenólicos totais (CFTs), flavonoides, atividade antioxidante por ABTS e FRAP das amostras com diferentes concentrações de própolis utilizada na extração com solvente hidroetanólico 84,5% de etanol.

g de própolis/ 100 mL	CFTs (mg de GA/mL PE)	Flavonoides (mg quer/mL PE)	ABTS (mM Trolox)	FRAP (mM FeSO ₄)
12,20	22,3 ± 0,0 c	4,1 ± 0,9 c	157 ± 7 c	196 ± 9 b
17,50	30,1 ± 1,0 b	9,9 ± 0,6 b	178 ± 2 b	246 ± 4 ab
25,00	37,5 ± 3,9 a	13,4 ± 1,2 a	214 ± 2 a	314 ± 49 a

Nessa tabela: Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). Valores identificados com letras iguais na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

A concentração de CFT variou de 22,3 a 37,5 mg GA/mL PE, e os flavonoides variaram de 4,1 a 13,4 mg quercetina/mL PE. As capacidades antioxidantes foram avaliadas usando ABTS e FRAP, resultando em 157 a 214 mM de Trolox (ABTS) e 196 a 314 mM de FeSO₄ (FRAP), respectivamente. Os valores encontrados para CFTs, flavonoides e ABTS para a amostra contendo 25,00 g de própolis / 100 mL de solvente foram significadamente maiores enquanto a amostra com 12,20g de própolis / 100 mL de solvente obteve menores valores para essas análises. Quando se observa os resultados de atividade antioxidante FRAP, não houve diferença significativa entre a amostra de 25,00 e 17,50 g de própolis / 100 mL de solvente, entretanto há uma tendência de resposta igual às outras análises.

A amostra contendo 25,00 g de própolis / 100 mL de solvente (84,5% etanol) foi a amostra com melhores resultados.

2.4. Conclusão

Os extratos de própolis vermelha utilizando ultrassom de ponteira e solução hidroetanólica como solvente continham altas concentrações de flavonoide e CFTs, indicando uma alta capacidade antioxidante, confirmado com os valores obtidos na pesquisa. Esse processo destacou-se pelo tempo de extração menor que os tradicionais e com solvente seguro para consumo. De acordo com a análise realizada, a concentração de CFTs e flavonoides foram diferentes significadamente para massa de própolis.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, n. September, p. 129–138, 2017.
- BANKOVA, V.; TRUSHEVA, B.; POPOVA, M. Propolis extraction methods: a review. **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 5, p. 734–743, 20 out. 2021.
- DE CAMPOS, J. V.; ASSIS, O. B. G.; BERNARDES FILHO, R. Processamento e análise de extratos de própolis verde como potencial sanitizante de uso hortifrutícola. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 2991–3002, 2021.
- DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184–1187, 1959.
- GOMES SÁ, S. H. et al. Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. **Food Research International**, v. 164, p. 112423, fev. 2023.
- HOCHHEIM, S. et al. Determination of phenolic profile by HPLC–ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 29, n. 3, p. 339–350, 2019.
- JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1395–1401, 1956.
- KASPRZAK, M. M.; ERXLEBEN, A.; OCHOCKI, J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **RSC Advances**, v. 5, n. 57, p. 45853–45877, 2015.
- KHANDARE, R. D.; TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Kinetic modeling and process intensification of ultrasound-assisted extraction of d-limonene using citrus industry waste. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 159, p. 108181, 1 fev. 2021.
- MÉNDEZ, L. M. R. **Produção, caracterização e estudo da estabilidade de filmes à base de gelatina e extrato de própolis vermelha enriquecidos com óleos essenciais de manjeriço (*Ocimum basilicum*), cravo (*Syzygium aromaticum*) ou hortelã (*Mentha piperita*)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2017.
- NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429–435, 2011.
- OROIAN, M.; URSACHI, F.; DRANCA, F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 64, n. November 2019, 2020.
- PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. 2000.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1 maio 1999.

REVILLA, I. et al. The potential of near infrared spectroscopy for determining the phenolic, antioxidant, color and bactericide characteristics of raw propolis. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 211–217, 2017.

REYES, L. M.; LANDGRAF, M.; SOBRAL, P. J. A. Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 27, n. June 2020, p. 100607, 2021.

RIGHI, A. A. et al. Brazilian red propolis: Unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2363–2370, 2011.

RUFATTO, L. C. et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. **Microbiological Research**, v. 214, p. 74–82, 1 set. 2018.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 24 jan. 1998.

**CAPÍTULO 3 . ENCAPSULAÇÃO DE
COMPOSTOS ATIVOS DE PRÓPOLIS
VERMELHA EM LIPOSSOMAS,
QUITOSSOMAS E TPP-QUITOSSOMAS COM
E SEM NANOCRISTAIS DE CELULOSE**

3.1. Introdução

Apesar dos muitos benefícios dos extratos de própolis, a sua utilização é limitada pelo seu sabor amargo e aroma. As técnicas de encapsulamento surgiram para ultrapassar estas dificuldades e melhorar a bioacessibilidade dos extratos de própolis. bioacessibilidade *in vitro* e atividade antioxidante (ALENCAR et al., 2023). Um polímero bastante estudado e que atualmente tem sido associado a outros é o das nanofibras de celulose (CNs), formando sistemas híbridos (ALMASI; JAFARZADEH; MEHRYAR, 2018; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). As CNs podem ser produzidas através de hidrólise ácida ou enzimática utilizando resíduos agroindustriais ricos em matrizes lignocelulósicas (MARTELLI-TOSI et al., 2018; SAMIR et al., 2004), e já foram empregadas em alguns sistemas carreadores de fármacos e vitaminas (AKHLAGHI et al., 2014; GRISHKEWICH et al., 2017; JACKSON et al., 2011; KOLAKOVIC et al., 2012; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

As CNs são normalmente produzidas em três etapas: tratamento básico e branqueamento, hidrólise ácida e fragmentação mecânica (ALEMDAR; SAIN, 2008; DHALI et al., 2021; MARTELLI-TOSI et al., 2017; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Os grupos hidroxilo (OH) das CNs favorecem as ligações de hidrogénio com outras moléculas polares; além disso, quando as CNs são obtidas por hidrólise com ácido sulfúrico, apresentam grupos -OSO₃- ao longo da sua estrutura que podem aumentar as interações electrostáticas. Essas duas características têm mostrado que os CNs podem formar nanocompósitos com polímeros catiônicos, como o polissacarídeo quitosana (ALMASI; JAFARZADEH; MEHRYAR, 2018; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020), identificados como sistemas híbridos.

A quitosana, um polissacárido catiônico, pode ser transformado em nanopartículas por complexação com poli(ácido metacrílico) (MOURA; AOUADA; MATTOSO, 2008), ou por gelificação iônica utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente de reticulação (BUGNICOURT; LADAVIÈRE, 2016). As nanopartículas resultam da ligação intra- e intermolecular entre os fosfatos carregados negativamente do TPP e os grupos amino carregados positivamente presentes na estrutura do quitosano (NH₃⁺). Tal sistema tem sido avaliado no encapsulamento das vitaminas C, B9 e B12, com redução satisfatória das degradações em meio aquoso, principalmente quando submetidas à exposição à luz e ao O₂ (BRITTO et al., 2012, 2014). Alguns estudos indicam a formação de um sistema híbrido com a associação da CN com nanopartículas de quitosana (ALMASI; JAFARZADEH; MEHRYAR, 2018; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020), mas ainda não há estudos da associação da CN com sistemas TPPChs.

A produção de lipossomas revestidos utilizando tripolifosfato de sódio para complexação com quitosano (TPPCh) já foi utilizada para a encapsulação de compostos ativos como a quercetina, vitamina D3 e carotenóides (CADDEO et al., 2016; ESPOSTO et al., 2022; IIDA et al., 2020), e os resultados foram promissores. A associação da CN com o TPPCh pode reter e preservar compostos positivamente ativos, como o sistema antioxidante proposto por Akhlaghi et al. (2014), pela formação de complexos entre a vitamina C e a CN enxertada com quitosano por complexação iônica usando TPP. Akhlaghi et al. (2014) observaram que a vitamina C era libertada ao longo do tempo, tendo o complexo também propriedades antioxidantes desejáveis.

Assim, esse capítulo abordará a preparação de um sistema híbrido, composto de quitosomas e CNs e a avaliação do potencial desses sistemas na formação de partículas e no encapsulamento de extratos enriquecidos com bioativos.

3.2. Material de métodos

3.2.1. Material

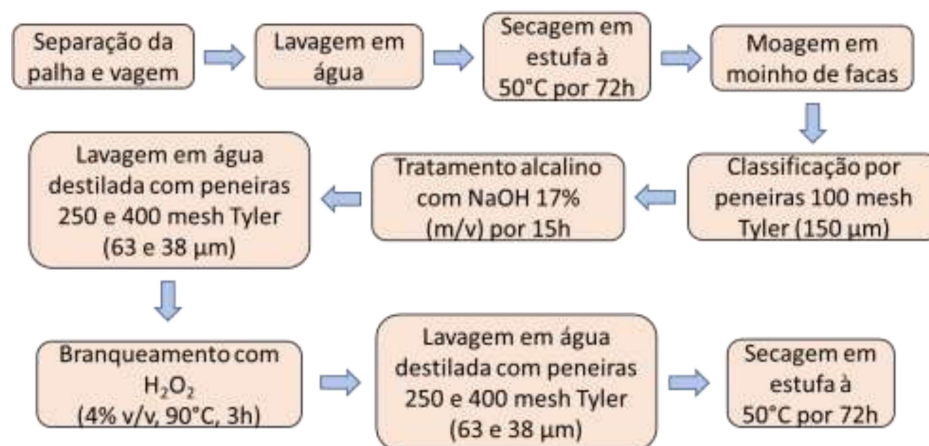
As partículas foram produzidas com: fosfolípido (Phospholipon 90G, Lipid Ingredients, Ribeirão Preto, Brasil), quitosana com peso molecular médio e 75-85% de unidades desacetiladas (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$, molecular weight 367.86 gmol^{-1} , Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). A palha de soja foi gentilmente doados pela Embrapa Soja (Londrina, PR, Brazil) e para produção de nanocristais de celulose, foi utilizado: hidróxido de sódio (NaOH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e ácido sulfúrico (H_2SO_4), adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA (Indaiatuba, SP, Brazil). Para a diálise das CNs, foi utilizado tubo de membrana de celulose com 76 mm de largura (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

3.2.2. Produção de Nanocristais de celulose

A produção de nanocelulose foi realizada de acordo com a metodologia adaptada de Martelli-Tosi et al. (2018) a partir da vagem mercerizada de soja. As vagens foram separadas, lavadas, e secas em estufa a 50°C , moídas e peneiradas em peneiras de 35 "mesh Tyler" (abertura 0,425 mm).

Na etapa de pré-tratamento, foi realizada a hidrólise parcial das hemiceluloses e ligninas, através de um tratamento alcalino com NaOH 17,5% (m/v) por 15h à temperatura ambiente, seguido de sucessivas lavagens com auxílio de peneiras de 250 e 400 “mesh Tyler” até neutralizar o pH. Em seguida, foi realizado o branqueamento com H₂O₂ 4% (v/v) + NaOH 2% (m/v) + MgSO₄ 7H₂O 0,3% (m/v) por 3 h à 90 °C, seguido de lavagens sucessivas utilizando peneira até pH neutro, de acordo com tratamento apresentado por Martelli-Tosi et al. (2017). A amostra pré-tratada foi seca em estufa a 50°C por 72 h. A Figura 3.1 apresenta o fluxograma realizado na etapa de pré tratamento da vagem de soja.

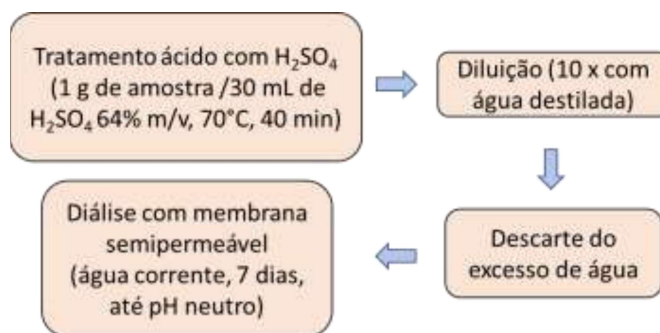
Figura 3.1. Fluxograma de pré-tratamento da soja para obtenção de nanocristais de celulose.



Fonte: Própria autoria.

Na etapa de hidrólise ácida ocorre a hidrólise das fibras e foi realizada utilizando 30 mL de H₂SO₄ 64% (v/v) por grama de vagem de soja mercerizada (MARTELLI-TOSI et al., 2018), a 70°C por 40 minutos sob agitação vigorosa e constante. Para cessar a reação, foi adicionado água destilada fria em uma proporção de 1:10 e então foi deixada em repouso por 24 h para decantação das fibras. Em seguida, foi realizada a diálise, onde o precipitado foi colocado dentro de uma membrana semipermeável e deixado em um recipiente com água. Esse processo ocorre entre 5 e 7 dias até o pH neutro ser atingido, pois há a remoção dos grupos sulfatos não reativos, sais e açúcares solúveis. A Figura 3.2 apresenta o fluxograma realizado na etapa de tratamento ácido da vagem de soja pré-tratada.

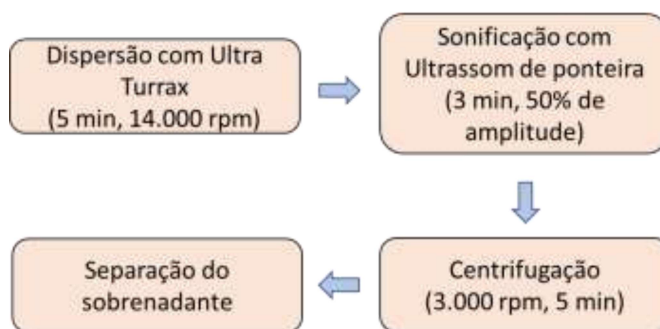
Figura 3.2. Fluxograma de tratamento ácido da vagem e/ou de soja pré-tratada para obtenção de nanocristais de celulose.



Fonte: Própria autoria.

A terceira e última etapa é a fragmentação mecânica, realizada com o auxílio de um dispersor tipo UltraTurrax (IKA T18 Basic, Guangzhou, China) a 14.000 rpm por 5 min e sonicada por 3 min contínuo e amplitude de 50% em ultrassom de ponteira de 550W de potência (Branson Ultrasonics Corp, Danbury, EUA). Para retirada das partículas maiores, a suspensão é centrifugada à 3000 rpm, a 25 °C por 5 min (Centrifuge 5430 R, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). O precipitado é então separado e o sobrenadante contendo as CNs dispersas foi armazenado em geladeira (8 °C). A Figura 3.3 apresenta o fluxograma realizado na etapa de tratamento fragmentação mecânica da vagem de soja.

Figura 3.3. Fluxograma de tratamento de fragmentação mecânica da vagem e/ou palha de soja para obtenção de nanocristal de celulose.



Fonte: Própria autoria.

3.2.2.1 Caracterização das CNs

A morfologia das CNs foi analisada por Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy* - AFM). As suspensões foram submetidas a sonificação por 3 minutos, contínuo e

50 % amplitude. A análise foi realizada na concentração de 0,01 % (m/v) e a secagem foi diretamente nos *stubs*. As CNs foram observadas no microscópio (NT-MDT, Rússia), com uma frequência de ressonância de 150 kHz, força de contato de 5 N/m e velocidade de varredura de 0,6 Hz.

A carga superficial das partículas foi analisada por espalhamento de luz eletroforético em um Zeta Potential Analyser – Nano Series- Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., England). As amostras foram diluídas 6x e as medidas foram realizadas a temperatura ambiente (25°C). Estas medidas foram realizadas em triplicata para cada amostra.

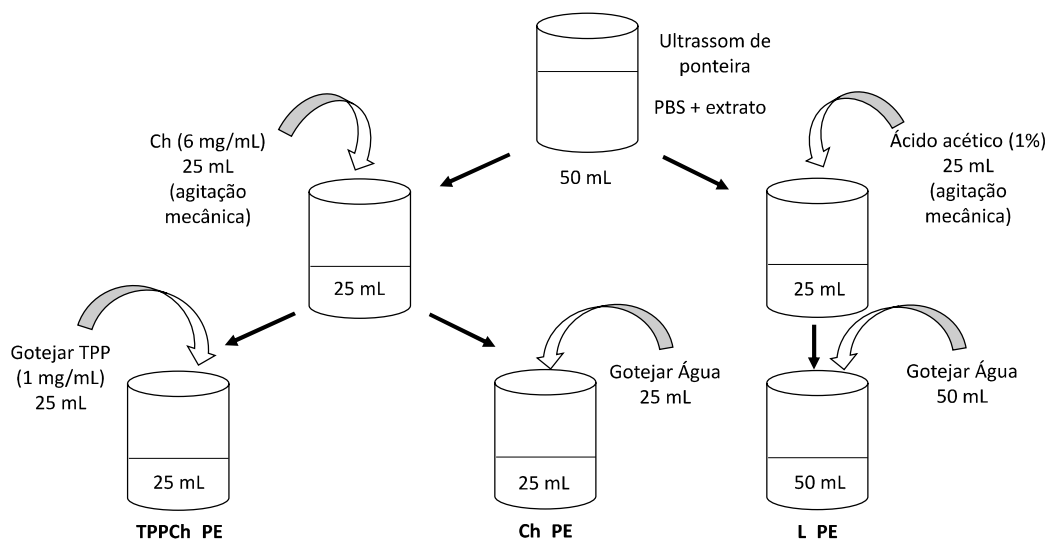
3.2.3. Encapsulação

As partículas de TPP-quitossomas (TPPCh) foram produzidas de acordo com o procedimento descrito por Caddeo et al. (2016), com algumas modificações, em triplicata. Foi utilizado o extrato de própolis vermelha obtido com 25g de própolis / 100mL de etanol (84.5%) (Tabela 2.2, Capítulo 2)

No extrato de própolis vermelha foi diluído fosfolipídio P90G (2,5 mg/mL) e adicionado tampão fosfato salino (PBS) (pH 7,4). Essas dispersões foram submetidas à sonificação (25 ciclos de 5 s, com pausa de 2 s a cada ciclo) para produção dos lipossomas (L). Em seguida, uma dispersão de igual volume de quitosana (para obter concentração final de 1,5 mg/mL) previamente preparada em solução de ácido acético (1% v/v) foi adicionada na suspensão para a produção das quitossomas (Ch) sob agitação magnética (1500 rpm). Em seguida, foi gotejado, lentamente com auxílio de uma bureta (1 mL/min, 8 cm de distância entre a gota e a superfície da suspensão), uma solução de igual volume de TPP (para obter concentração final de 0,5 mg/mL). A amostra final foi identificada como TPP-quitossomas (TPPCh). As amostras foram armazenadas em congelador ao abrigo de luz. A Figura 3.4 apresenta o fluxograma de produção das partículas produzidas.

As amostras híbridas com CN foram preparadas com a adição da suspensão de CN (0,29 %) na solução de ácido acético utilizado na solubilização da quitosana. A composição e identificação das amostras estão apresentadas na Tabela 3.1.

Figura 3.4. Fluxograma de produção dos sistemas híbridos carregados de extrato de própolis.



Fonte: Própria autoria.

Tabela 3.1. Identificação e composição final das amostras.

Identificação	Fosfolipídio (g/L)	Quitosana (g/L)	TPP (g/L)	CN (g/L)
L-PE	0,625	-	-	-
Ch-PE	0,625	1,5	-	-
TPPCh-PE	0,625	1,5	0,5	-
CN-L	0,625	-	-	0,7
CN-Ch	0,625	1,5	-	0,7
CN-TPPCh	0,625	1,5	0,5	0,7
CN-L-PE	0,625	-	-	0,7
CN-Ch-PE	0,625	1,5	-	0,7
CN-TPPCh-PE	0,625	1,5	0,5	0,7

Fonte: Própria autoria.

3.2.2.2 Eficiência de Encapsulação

A retenção de PE no sistema híbrido foi estimada pela quantificação de bioativos por espectroscopia UV-Visível (Genesys 10S UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) seguindo metodologia proposta por Esposto et al. (2022) com algumas modificações. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm, a 4 °C por 10 min (5430R, Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) usando Amicon Ultra-0,5 (Amicon Ultra-0,5 mL 3 K device, Millipore Corp., Irlanda) para separar os CFT livres, das partículas carregadas, segundo Machado et al.

(2019). A solução filtrada foi então utilizada para quantificar os CFT pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu. A eficiência (EE) foi calculada como a diferença entre a concentração total de bioativos na amostra do extrato encapsulado [PE] e a concentração de bioativos quantificados no sobrenadante [PE], conforme Eq. 3.1.

$$EE (\%) = \frac{[PE]_{sample} - [PE]_{supernatant}}{[PE]_{sample}} * 100 \quad (3.1)$$

3.2.4. Caracterização das partículas

3.2.3.1. Morfologia

A morfologia do sistema híbrido foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) segundo Caddeo et al. (2016) com algumas modificações. As suspensões foram submetidas a tratamento em banho ultrassônico de 2 minutos, seguido de diluição em água mili-Q nas proporções de 1:30 e 1:60. As amostras diluídas foram gotejadas em uma grade revestida de carbono, corada com acetato de uranilo 1,5% (solução aquosa). Após secagem por 24 h, à temperatura ambiente e finalmente analisadas com um microscópio JEM 100CXII (Tóquio, Japão) com uma voltagem de aceleração de 80 kV.

3.2.3.2. Tamanho de partícula e potencial zeta

O tamanho de partícula, sua distribuição e os potenciais zeta foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando um Analisador de Potencial Zeta (Zetasizer ZS 3600, Malvern Instruments, UK) num ângulo de detecção de 173 ° e comprimento de onda de 633 nm. As medições foram realizadas em triplicado a 25°C.

3.2.3.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As suspensões de partículas foram liofilizadas no equipamento Liobras, Liotop L101 (São Carlos, Brasil) para realização das análises de FTIR. e TGA.

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) foram realizadas em um espectrofotômetro (Spectrum-One, Perkin Elmer, Shelton, EUA)

com acessório de atenuação de transmitância universal, modelo ATR. Foram realizadas 16 varreduras entre 550 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

3.2.3.4. Análise termogravimétrica

As propriedades térmicas dos sistemas híbridos liofilizados foram avaliadas em analisador termogravimétrico TGA-Q500 (TA Instruments, New Castle, EUA), utilizando 10 mg de cada amostra selada em recipientes de platina. As amostras foram aquecidas de 20 a 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ sob fluxo de nitrogênio de 60 cm³ /min.

3.2.5. Análise estatística

As análises, tamanho de partícula, potencial zeta e EE, foram avaliadas estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5%, com o auxílio do software XLSTAT.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Produção de nanocristais de celulose (CN)

Para a produção de CNs, inicialmente a vagem foi pré-tratada para a solubilização parcial das hemiceluloses e ligninas, a fim de obter um material rico em celulose (~ 66 %), comparado com a vagem não tratada (~ 40%). O pré-tratamento utilizado foi escolhido de acordo com trabalhos prévios (MARTELLI-TOSI et al., 2017; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020), sendo que o rendimento obtido neste estudo foi de 45% (g vagem tratada/100g de vagem).

Após o pré-tratamento, foram realizadas a hidrólise ácida, diálise e fragmentação mecânica. A suspensão pode ser observada na Figura 3.5 e seu rendimento foi de $0,28 \pm 0,01$ % (m/m) de matéria seca.

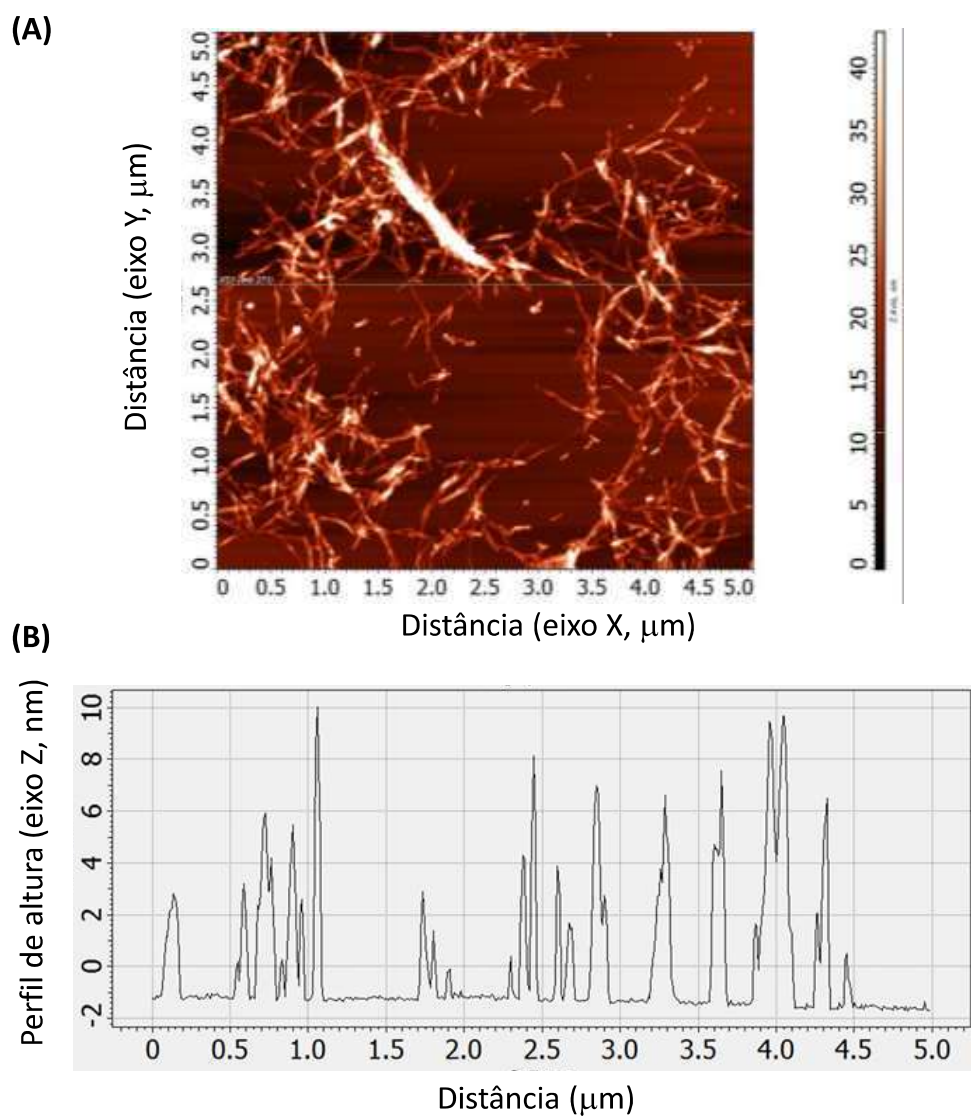
Figura 3.5. Suspensão de CNs.



Fonte: Própria autoria.

A micrografia representativa da estrutura das CN e o perfil de altura (nm) obtidos por microscopia de força atômica estão apresentados na Figura 3.6A e B, respectivamente. As fibras de celulose apresentadas na micrografia estão em nanoescala e seu diâmetro foi de até 12 nm, como pode ser observado no perfil de altura obtido a partir da micrografia (Figura 3.6 B). Martelli-Tosi et al. (2018), obtiveram diâmetros médios semelhantes ($9,4 \pm 3,3$ nm) realizando os mesmos pré-tratamentos e hidrólise ácida com a palhada de soja, entretanto o comprimento se mostrou diferente. Alemdar e Sain, (2008) obtiveram diâmetros maiores das CNs oriundas de palha de trigo e da casca de soja (30 - 40 nm e 20 - 120 nm, respectivamente). Na escala nanométrica, a morfologia da celulose não depende apenas do método de extração, mas também da variedade/tipo de matéria-prima lignocelulósica.

Figura 3.6. (A) Micrografia representativa da estrutura das CNs e (B) perfil de altura (nm) obtidos por microscopia de força atômica (AFM).



Fonte: Própria autoria.

3.3.2. Encapsulação do extrato

A eficiência de encapsulação das partículas foram realizadas e estão apresentadas na Tabela 3.2, tanto para Compostos Fenólicos Totais (CFTs) e quanto flavonoides. Os flavonoides exibiram resultados de encapsulamento mais elevadas em todas as amostras, com taxas próximas de 100%, independentemente do material encapsulante utilizado. Tendo em vista a solubilidade inerente dos flavonoides livres em vários solventes orgânicos, tais como

metanol, etanol, clorofórmio e éter, o seu encapsulamento ocorreu predominantemente dentro da bicamada durante a produção de lipossomas. Apesar da amostra de CN-Ch-PE apresentar diferença significativa, ela ainda possui uma alta EE. Essas descobertas estão alinhadas com pesquisas anteriores sobre partículas semelhantes que exploram o encapsulamento de carotenoides (ESPOSTO et al., 2022).

Em relação ao CFT, foram quantificados outros compostos fenólicos, e o EE não apresentou diferença significativa, entretanto observa-se pequenas diferenças dependendo do agente encapsulante. L e TPPCh exibiram os maiores valores. CN-Ch-PE apresentou maior instabilidade e desvio padrão, sugerindo que a reticulação da quitosana com o TPP é crucial para a estabilização das partículas.

Tabela 3.2. Eficiência de encapsulação das partículas carregadas com extrato de própolis vermelha pela quantificação de CFT e flavonoides. Sendo L-PE, lipossoma; Ch-PE, quitossomas; TPPCh-PE, TPP-quitossomas; CN-L-PE, lipossomas com nanocristais; CN-Ch-PE, quitossomas com nanocristais e CN-TPPCh-PE, TPP-quitossomas com nanocristais.

Amostras	EE para CFTs (%)	EE para flavonoides (%)
L-PE	92,5 ^a ± 0,3	99,92 ^a ± 0,01
Ch-PE	90,4 ^a ± 1,1	99,93 ^a ± 0,01
TPPCh-PE	92,0 ^a ± 0,2	99,87 ^{ab} ± 0,02
CN-L-PE	91,8 ^a ± 1,0	99,85 ^{ab} ± 0,07
CN-Ch-PE	90,6 ^a ± 5,3	99,76 ^b ± 0,04
CN-TPPCh-PE	91,1 ^a ± 1,2	99,89 ^{ab} ± 0,04

Nessa tabela: Os valores apresentam a média ± desvio padrão (n =3). Valores identificados com letras iguais na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

3.3.3. Caracterização das partículas

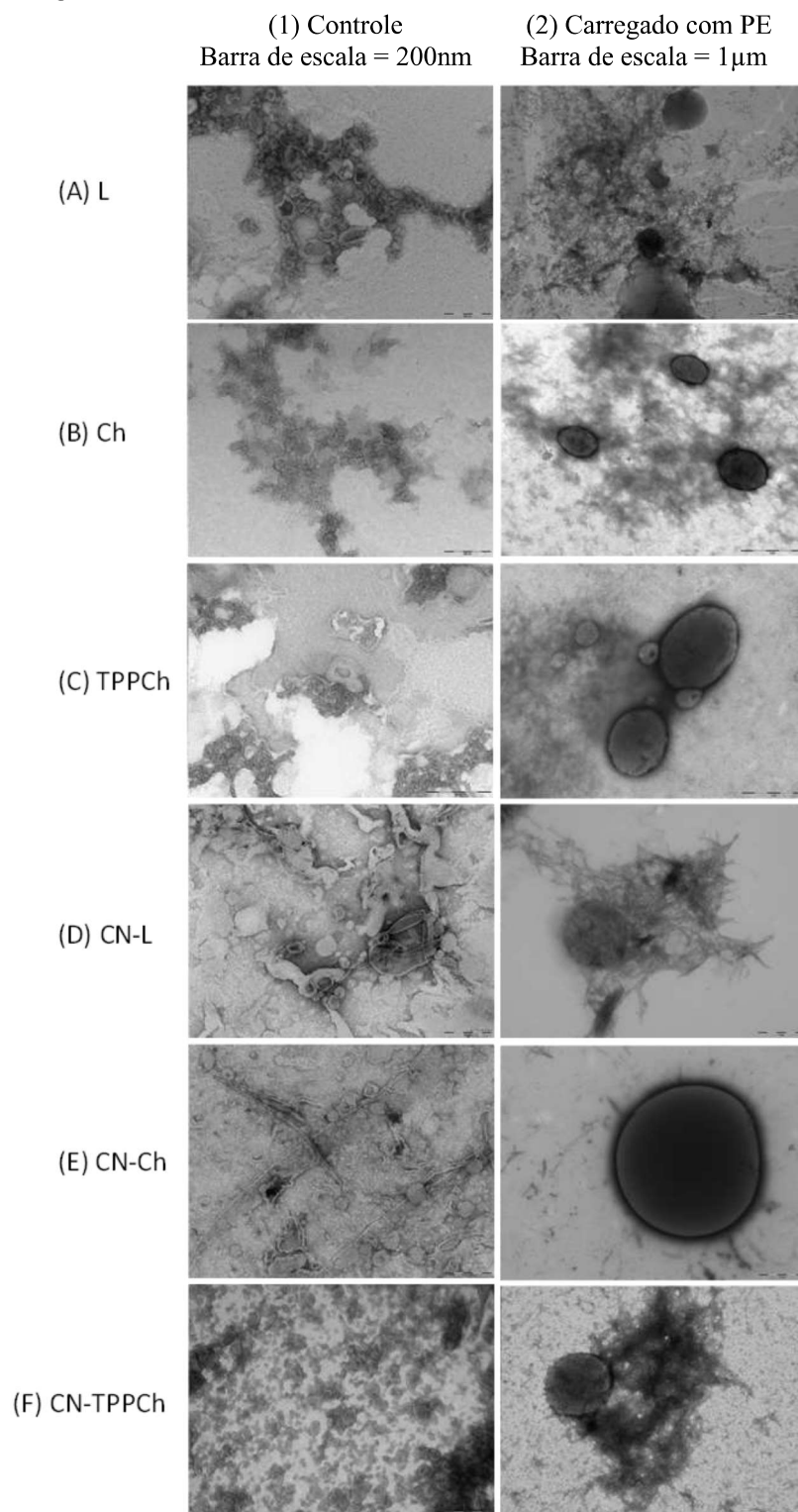
3.3.2.1. Morfologia

A Figura 3.7 ilustram as micrografias MET das partículas sem PE e carregadas com PE.. Os lipossomas (L), observadas na Figura 3.7.A1, apresentaram formas esféricas e elípticas, constituídos por uma única bicamada lipídica, tendo tamanhos de partículas inferiores a 200 nanômetros. Por outro lado, os quitossomas (Ch), embora também apresentem tamanhos

nanométricos, foi observado a presença de aglomerados (Figura 3.7.B1). Quando as partículas de Ch são reticuladas com TPP (TPP-Ch), surge uma rede de polímeros em torno dos lipossomas (Figura 3.7.C1), conforme relatado na literatura (ESPOSTO et al., 2022). Quando essas partículas foram carregadas com PE, foi possível a observação dos resíduos da própolis nas micrografias. A incorporação de PE também ocasionou acréscimo no tamanho, possivelmente devido à incorporação dos compostos ativos, além de tornar mais difícil a visualização das bicamadas (Figura 3.7.A2, B2 e C2).

As Figuras 3.7 D1, F1 e G1 apresentam as micrografias MET dos sistemas híbridos formados com a adição de nanofibras de celulose (CN). Nela foi possível observar a aglomeração de CN, sendo a visualização mais pronunciada nas partículas carregadas de PE. Entretanto, foram observados nanocristais fixados nas superfícies das partículas. Okamoto-Schalch et al.(2020), apresentaram a incorporação de CN em sistemas híbridos de quitosana reticulada por TPP e verificaram a adsorção de CN na superfície das partículas atribuída à interação eletrostática entre os polímeros de quitosana e CN.

Figura 3.7. Micrografias MET: (1) partículas e não carregadas com PE: lipossomas (L), quitossomas (Ch) e TPP-quitossomas (TPPCh) sem nanocristais de celulose (A, B e C, respectivamente) e com nanocristais de celulose (D, E e F, respectivamente); (2) Partículas carregadas com extrato de própolis.



Fonte: Própria autoria.

3.3.2.2. Tamanho de partícula e potencial zeta

O diâmetro médio das partículas (*Z-average*) e seu índice de polidispersidade (PDI) foram medidos por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e os resultados são mostrados na Tabela 3.3. As partículas sintetizadas não foram homogêneas com índices de polidispersidade em todos os casos abaixo de 0,36.

Observa-se que as partículas L não carregadas apresentaram tamanho médio de 255 ± 62 nm, constituindo tamanho nanométrico, já quando foi inserido as CN nos lipossomas, o tamanho se aproximou de 400 nm. Os resultados de tamanho obtidos para as partículas carregadas são compatíveis com as micrografias apresentadas na Figura 3.7.A2, B2 e C2, pois há um acréscimo considerado nos valores de Z, principalmente devido aos resíduos de própolis.

Os TPP-quitossomas carregados (TPPCh-PE) apresentaram diâmetros maiores que 9 μm sendo maiores que os lipossomas e quitossomas carregados (L-PE e Ch-PE) com aproximadamente 5 μm . Isso é esperado pois são obtidos pela incorporação da quitosana à superfície do lipossoma formando uma camada superficial.

As partículas contendo CN e carregadas com PE não apresentaram diferenças significativas, com diâmetros na faixa de 9 μm , provavelmente atribuídos ao fato do comprimento micrométricos da fibra. Esse aumento também foi observado nas partículas com CN sem extrato, confirmado por aglomerados nas micrografias Figura 3.7.D2 e F2.

Os valores do potencial zeta também estão na Tabela 3.3. Os grupos carboxila dos fosfolípidios conferiram potenciais zeta próximos à neutralidade para as amostras de lipossomas ($+0,56 \pm 0,89$ mV para L e $-2,9 \pm 0,3$ mV para CN-L). Ao adicionar a quitosana (amostras Ch e TPPCh), os valores passaram a ser positivos ($+42,5 \pm 1,5$ mV e $+29,2 \pm 1,7$ mV, respectivamente). Esta mudança de potencial, invertendo os valores negativos para positivos sugere novamente que houve uma adsorção dos grupos amino carregados positivamente da quitosana nos lipossomas (CADDEO et al., 2016; ESPOSTO et al., 2022) e também a possível interação eletrostática entre o NH_3^+ da quitosana e o SO_4^{2-} das CNs (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

As partículas carregadas com extrato (L-PE, Ch-PE, TPPCh-PE) sem a presença de CN, apresentaram valores do potencial zeta positivos. Sendo que os quitossomas e os TPP-quitossomas exibiram valores superiores a + 30 mV, indicando sua maior estabilidade em relação à amostra L ($+13,6 \pm 4,6$ mV). A inclusão de CNs (CN-L-PE) resultou numa diminuição dos valores do potencial zeta das amostras L, atribuída principalmente às nanofibras carregadas

negativamente preparadas com uma solução de ácido sulfúrico, que reteve SO_4^{2-} nas suas superfícies. Novamente, a adição de quitosana inverteu os valores do potencial zeta (CN-Ch-PE: $+45,0 \pm 1,2$ mV e CN-TPPCh-PE: $+32,3 \pm 0,8$ mV), confirmando a adsorção de quitosana nos lipossomas, aumentando assim a estabilidade das partículas.

A reticulação da quitosana com TPP diminuiu ligeiramente o valor do potencial zeta, de +45 para +33 mV, independentemente da presença de nanofibras. Este fenómeno pode ser atribuído à interação dos grupos fosfato do TPP com os sítios de carga positiva da quitosana (NH_3^+), o que reduziu a disponibilidade de sítios positivos nas superfícies.

Logo, as amostras baseadas em Ch e TPPCh apresentaram maior potencial zeta e, conseqüentemente, a maior estabilidade, independentemente da presença de PE ou CN. Os lipossomas revestidos com quitosana também mostraram mais estáveis do que os L quando encapsularam outros bioativos, como os carotenoides (ESPOSTO et al., 2022) e a vitamina D3 (ALDANA-MEJÍA et al., 2021).

Tabela 3.3. Diâmetro médio (*Z-average*) (nm) e índice de polidispersidade (PDI) das partículas obtidas por espalhamento de luz dinâmico e potencial Zeta (mV) das suspensões.

Amostras	<i>Z-average</i> (nm)	PdI	Potencial zeta (mV)
L	255 ± 62	$0,36 \pm 0,01$	$+0,56 \pm 0,89$ ^a
CN-L	378 ± 168	$0,56 \pm 0,17$	$-2,9 \pm 0,3$ ^a
CN-Ch	324 ± 151	$0,78 \pm 0,22$	$+42,5 \pm 1,5$ ^b
CN-TPPCh	498 ± 145	$0,88 \pm 0,09$	$+29,2 \pm 1,7$ ^c
L-PE	5.327 ± 741	$0,66 \pm 0,26$	$+13,6 \pm 4,6$ ^d
Ch-PE	4.155 ± 1.849	$0,72 \pm 0,14$	$+47,3 \pm 0,7$ ^e
TPPCh-PE	9.588 ± 2.360	$0,55 \pm 0,19$	$+33,5 \pm 2,4$ ^f
CN-L-PE	8.227 ± 862	$0,72 \pm 0,15$	$-17,2 \pm 2,7$ ^g
CN-Ch-PE	6.441 ± 3.112	$0,64 \pm 0,18$	$+45,0 \pm 1,2$ ^{be}
CN-TPPCh-PE	8.301 ± 1.297	$0,69 \pm 0,02$	$+32,3 \pm 0,8$ ^{cf}

Nessa tabela: Os valores apresentam a média \pm desvio padrão (n =3). Valores identificados com letras iguais na mesma coluna não diferem, estatisticamente, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Fonte: Própria autoria.

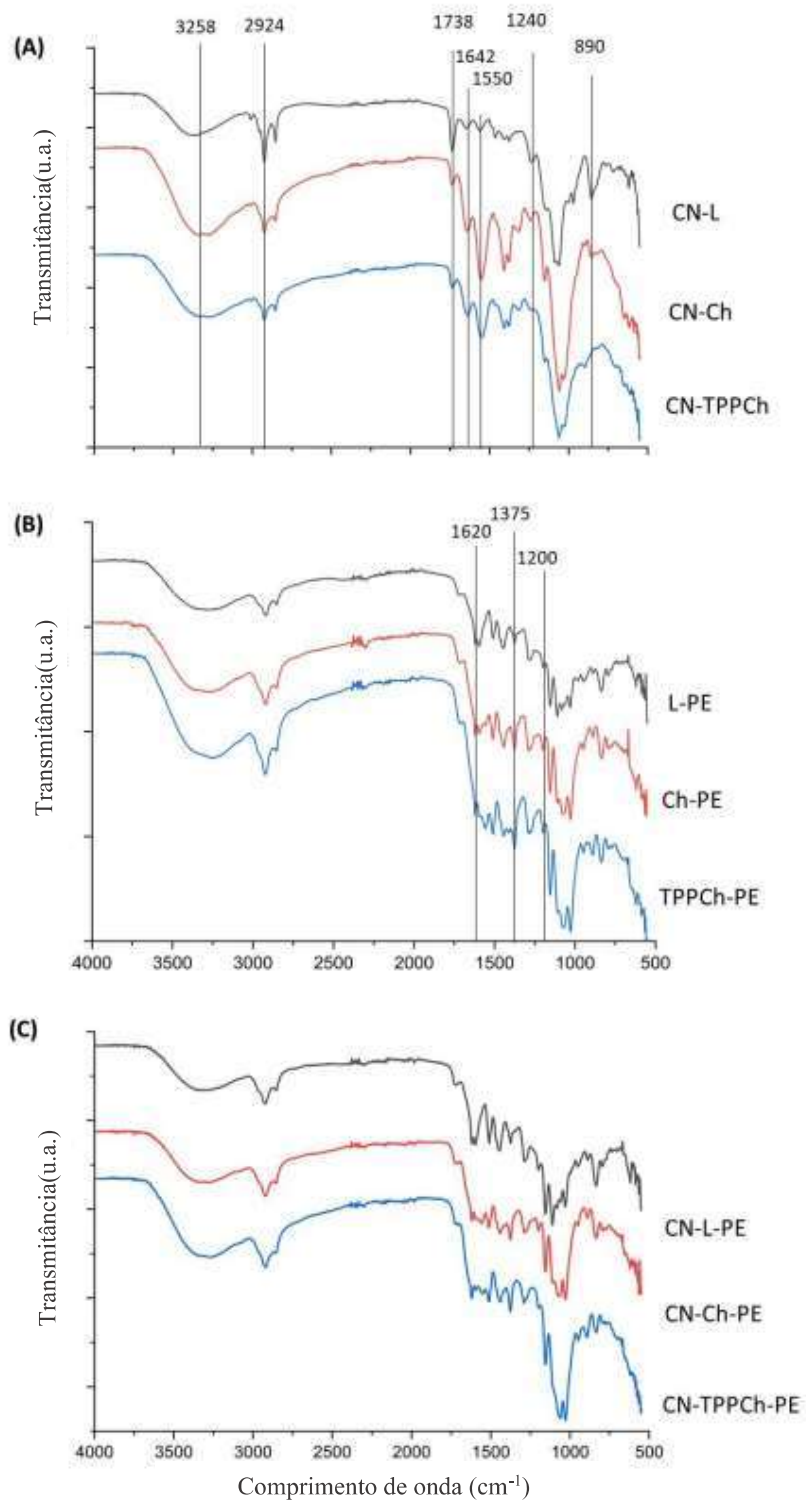
3.3.2.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros de FTIR foram determinados para avaliar as estruturas químicas. Os resultados das amostras sem PE produzidas com CN, amostras carregadas com PE e amostras com CN e PE são apresentados nas Figura 3.8A, B e C, respectivamente.

A banda em 3258 cm^{-1} , observada em todas as amostras, corresponde a vibrações de estiramento simétrico de grupos hidroxila O-H da ligação H (NIENHAUS; NIENHAUS, 2008). Os picos em 2924 e 2854 cm^{-1} são característicos do sinal de estiramento CH de cadeias de ácidos graxos típicos de lipossomas contendo compostos alifáticos lineares de cadeia longa. A banda em 1724 cm^{-1} é referente à vibração C=O nos grupos carboxila, característica associada às partículas à base de CN conforme demonstrado nas Figura 3.8A e C (MARTELLI-TOSI et al., 2018). Algumas bandas são atribuídas à estrutura da quitosana: carbonila (C = O-NHR) em 1640 cm^{-1} e grupo amina (flexão -NH₂) em 1550 cm^{-1} . As bandas entre 1000 e 1200 cm^{-1} são atribuídas à estrutura sacarídica da quitosana (OSMAN; AROF, 2003). No CN-TPPCh, bandas mais fracas em 1240 cm^{-1} (vibração de alongamento P = O) e em 890 cm^{-1} (alongamento assimétrico POP), em comparação com CN-Ch sugerem complexação entre quitosana e tripolifosfato. Notavelmente, diferenças na banda em 1080 cm^{-1} , atribuídas ao estiramento das ligações C-O de álcoois primários, destacam ainda mais a reticulação (MARTINS et al., 2012).

Os espectros apresentados das amostras com incorporação de extrato de própolis, sem CN (Figura 3.8B), exibiram diferenças perceptíveis em comparação com partículas vazias estudadas em nosso trabalho anterior (ESPOSTO et al., 2022). As principais diferenças dizem respeito à presença de compostos de própolis: o estiramento C-O dos anéis fenólicos a 1200 cm^{-1} foi observado apenas nos espectros de partículas contendo extrato de própolis (Figura 3.8B e C). A banda em 1375 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} estaria relacionada a compostos heterocíclicos (C-O-C) encontrados em alcaloides e flavonas (BARBOSA et al., 2019). O pico em 1640 cm^{-1} para amostras sem PE (Figura 3.8A) deslocou-se para 1620 cm^{-1} para amostras contendo PE, independentemente da presença de CNs (Figura 3.8B e C). Além disso, alterações de outros picos atribuídos aos sacarídeos ($1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$) também foram observadas para partículas carregadas de PE, indicando a possibilidade de interações fracas entre compostos de própolis e quitosana. Não foram observadas diferenças espectrais quando CNs foram adicionados às partículas (Figura 3.8C). Este fenômeno sugere que não houve alteração significativa na estrutura da vesícula lipossômica com a incorporação de CNs.

Figura 3.8. Espectros FTIR das: (A) das partículas vazias produzidas com CN: lipossomas (CN-L), quitossomas (CN-Ch) e TPP-quitossomas (CN-TPP-Ch), (B) partículas carregadas com extrato de própolis (PE) e sem CNs e (C) partículas carregadas com PE na presença de CN.



Fonte: Própria autoria.

3.3.2.4. Análise termogravimétrica

A Figura 3.9 apresenta as curvas TGA obtidas para as amostras com nanocristal de celulose e sem extrato de própolis (Figura 3.9A); com extrato de própolis e sem CN (Figura 3.9B) e as amostras com CN e carregadas com extrato de própolis (Figura 3.9C).

A perda inicial de massa na região de 130°C está relacionada à evaporação da água e corresponde até 10% da massa inicial.

Ao comparar as partículas liofilizadas CN-L, L-PE e CN-L-PE, observou-se que, em geral, elas apresentaram uma perda de massa inicial em torno de 3% a 97,71°C, correspondendo à dessorção de água e voláteis ligados física e quimicamente. As amostras de quitossomas (CN-Ch, Ch-PE e CN-Ch-PE) tiveram perda de massa inicial de 10,1%, 6,5% e 4,4%, respectivamente. E as amostras de quitossomas TPP, CN-TPPCh, TPPCh-PE e CN-TPPCh-PE, tiveram perda inicial de 7,6%, 4,8% e 3,9%, respectivamente. A perda, referente à água, foi maior nas amostras sem extrato, provavelmente porque os compostos ativos e resíduos de própolis retêm água em suas estruturas.

Quando analisadas as amostras contendo PE, observa-se uma degradação maior em torno de 500°C, que representa de 10 a 21% de perda de massa. Essa degradação pode ser decorrente da degradação de compostos de própolis (DO NASCIMENTO et al., 2022; DUARTE, 2020). De acordo com Pant et al. (PANT et al., 2022), a etapa final de degradação é atribuída principalmente à decomposição de lipídios, aminoácidos e fibras presentes na própolis. Proteínas expostas a temperaturas mais altas podem levar ao desdobramento da estrutura secundária.

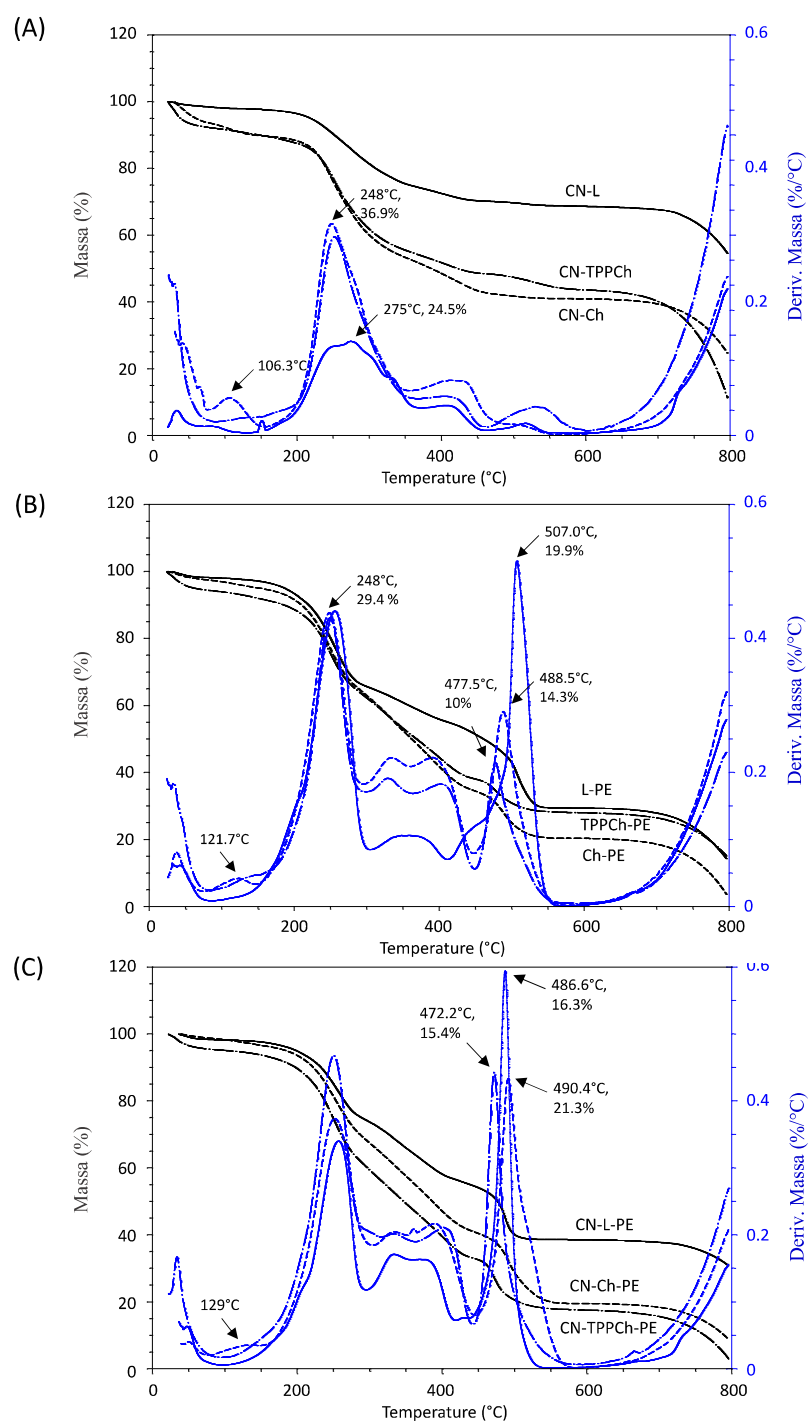
Uma pequena degradação é observada nas amostras de Ch (CN-Ch, Ch-PE e CN-Ch-PE) a aproximadamente 125°C, o que indica a presença de quitosana não reticulada nas amostras. A quitosana possui dois picos de degradação, um entre temperaturas de 115°C e 250°C, outro entre 250°C e 317°C (DO NASCIMENTO et al., 2022).

A segunda fase de degradação é claramente evidente em todas as amostras e tem perda máxima de 248 a 275 °C. Nesta etapa as amostras apresentaram perdas de 24 a 37% e foi o pico de degradação da quitosana e do fosfolipídio (DAVE et al., 2020; DO NASCIMENTO et al., 2022). Nesta fase ocorre desacetilação e clivagem das ligações glicosídicas das cadeias poliméricas, provocando a decomposição do carbono residual.

Houve diminuição da estabilidade térmica ao adicionar quitosana às amostras, portanto os lipossomas apresentaram maior estabilidade, isso pode ser justificado como consequência das interações iônicas entre o fosfolipídio e a quitosana.

Quando observamos as amostras com própolis adicionada ou não de CN (Figura B e C), podemos observar um aumento na estabilidade térmica a 300°C na presença de CN, uma vez que a celulose tem temperatura máxima de degradação em torno de 320°C (FLAUZINO NETO et al., 2013).

Figura 3.9. Degradação térmica em função da temperatura (TGA e DTG) das: (A) das partículas vazias produzidas com CN: lipossomas (CN-L), quitossomas (CN-Ch) e TPP-quitossomas (CN-TPP-Ch), (B) partículas carregadas com extrato de própolis (PE) e sem CNs e (C) partículas carregadas com PE na presença de CN.



Fonte: Própria autoria.

3.4. Conclusão

As análises granulométricas demonstraram que as partículas controle L eram em escala nanométrica enquanto os sistemas híbridos contendo CNs eram maiores, e com a adição de PE o tamanho das partículas aumentou significativamente, atingindo a escala micrométrica. A adição de quitosana aos lipossomas inverteu os valores do potencial zeta, de negativo para positivo, confirmando a adsorção da quitosana nos lipossomas, aumentando assim a estabilidade das partículas. Os próximos passos são a incorporação desses sistemas híbridos carregados com extrato de própolis em criogéis.

REFERÊNCIAS

- AKHLAGHI, S. P. et al. Comparative release studies of two cationic model drugs from different cellulose nanocrystal derivatives. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n. 1, p. 207–215, 1 set. 2014.
- ALDANA-MEJÍA, J. A. et al. A validated HPLC-UV method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 198, p. 114029, 10 maio 2021.
- ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, 1 abr. 2008.
- ALENCAR, S. M. DE et al. Dynamic gastrointestinal digestion/intestinal permeability of encapsulated and nonencapsulated Brazilian red propolis: Active compounds stability and bioactivity. **Food Chemistry**, v. 411, p. 135469, jun. 2023.
- ALMASI, H.; JAFARZADEH, P.; MEHRYAR, L. Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 273–281, 15 abr. 2018.
- BARBOSA, H. F. G. et al. A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, p. 115232, 1 dez. 2019.
- BRITTO, D. et al. N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 487–493, 1 jun. 2012.
- BRITTO, D. et al. Entrapment characteristics of hydrosoluble vitamins loaded into chitosan and N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 22, n. 12, p. 1261–1267, 2014.
- BUGNICOURT, L.; LADAVIÈRE, C. Interests of chitosan nanoparticles ionically cross-linked with tripolyphosphate for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 1–17, 1 set. 2016.
- CADDEO, C. et al. Cross-linked chitosan/liposome hybrid system for the intestinal delivery of quercetin. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 461, p. 69–78, 2016.
- DAVE, V. et al. PEGylated PLA-Phospholipon 90G complex hybrid nanoparticles loaded with etoricoxib for effective treatment pain relief potential. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 69, n. 10, p. 640–652, 2 jul. 2020.
- DHALI, K. et al. A review of nanocellulose as a new material towards environmental sustainability. **Science of The Total Environment**, v. 775, p. 145871, 25 fev. 2021.

DO NASCIMENTO, T. G. et al. Preparation and characterization of chitosanates loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 147, n. 14, p. 7837–7848, 2022.

DUARTE, I. F. B. **ESTUDO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E MICROBIOLÓGICA DOS EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2020.

ESPOSTO, B. S. et al. TPP-chitosomes as potential encapsulation system to protect carotenoid-rich extract obtained from carrot by-product: A comparison with liposomes and chitosomes. **Food Chemistry**, v. 397, p. 133857, 15 dez. 2022.

FLAUZINO NETO, W. P. et al. Extraction and characterization of cellulose nanocrystals from agro-industrial residue - Soy hulls. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 480–488, 2013.

GRISHKEWICH, N. et al. Recent advances in the application of cellulose nanocrystals. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 29, p. 32–45, 1 maio 2017.

IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polimeros**, v. 29, n. 4, p. 1–8, 2020.

JACKSON, J. K. et al. The use of nanocrystalline cellulose for the binding and controlled release of drugs. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 321–330, 2011.

KOLAKOVIC, R. et al. Nanofibrillar cellulose films for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n. 2, p. 308–315, 2012.

MACHADO, A. R. et al. Liposomes loaded with phenolic extracts of Spirulina LEB-18: Physicochemical characterization and behavior under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 120, p. 656–667, 1 jun. 2019.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Chemical treatment and characterization of soybean straw and soybean protein isolate/straw composite films. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 512–520, fev. 2017.

MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61–68, out. 2018.

MARTINS, A. F. et al. Chitosan/TPP microparticles obtained by microemulsion method applied in controlled release of heparin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 5, p. 1127–1133, 1 dez. 2012.

MOURA, M. R.; AOUADA, F. A.; MATTOSO, L. H. C. Preparation of chitosan nanoparticles using methacrylic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 321, n. 2, p. 477–483, 15 maio 2008.

NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Ligand Dynamics in Heme Proteins Observed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy at Cryogenic Temperatures. **Methods in Enzymology**, v. 437, p. 347–378, 2008.

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Production and characterization of chitosan-TPP/cellulose nanocrystal system for encapsulation: a case study using folic acid as active compound. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5855–5869, 2020.

OSMAN, Z.; AROF, A. K. FTIR studies of chitosan acetate based polymer electrolytes. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 8, p. 993–999, 5 abr. 2003.

PANT, K. et al. Assessment of fatty acids, amino acids, minerals, and thermal properties of bee propolis from Northern India using a multivariate approach. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 111, p. 104624, 1 ago. 2022.

SAMIR, M. A. S. A. et al. Tangling Effect in Fibrillated Cellulose Reinforced Nanocomposites. **Macromolecules**, v. 37, n. 11, p. 4313–4316, 1 jun. 2004.

**CAPÍTULO 4 . ELABORAÇÃO DE CRIOGÉIS
ATIVOS DE QUITOSANA CONTENDO
COMPOSTOS ATIVOS ENCAPSULADOS EM
TPP-QUITOSSOMAS E NANOCRISTAIS DE
CELULOSE**

4.1. Introdução

Os principais desafios associados ao consumo do extrato de própolis incluem a estabilidade dos compostos bioativos, sabor amargo e odor resinoso da própolis. Conseqüentemente, técnicas de encapsulamento têm sido pesquisadas para mascarar a percepção de sabor e odor, ao mesmo tempo que protegem os bioativos da oxidação e melhoram sua biodisponibilidade (TAVARES et al., 2022). Vários sistemas de encapsulamento foram estudados, incluindo spray-chilling, spray-drying (BUSCH et al., 2017; GOMES SÁ et al., 2023), nanopartículas de proteína de soro de leite (SHAKOURY et al., 2022) e lipossomas. Essas partículas podem ser incorporadas em outras matrizes poliméricas, como hidrogéis ou criogéis, para adequar o produto à aplicação final.

Os géis secos podem ser obtidos utilizando diferentes técnicas de secagem, que podem influenciar a estruturação do gel seco e, conseqüentemente, às suas propriedades mecânicas e de permeabilidade. Aerogéis, criogéis ou xerogéis são classificados com relação ao processo de secagem pelo qual passaram, sendo, respectivamente: supercrítica, liofilização ou evaporação à temperatura ambiente. A porosidade desses géis secos à base de celulose ou quitosana pode variar de 70-80% para xerogéis a 90-96% para aerogéis e criogéis (GANESAN et al., 2016; ZHANG et al., 2019).

Criogéis à base de quitosana têm sido estudados como sistemas transportadores para aplicações farmacêuticas ou alimentícias devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioadesividade (ROLLINI et al., 2017). Os criogéis possuem diversas propriedades excepcionais, sendo utilizados para inúmeras aplicações e, quando obtidos a partir de material biocompatível, podem ser utilizados como veículo para compostos ativos (BÖLGEN et al., 2020; ZHANG et al., 2016).

Estruturas altamente porosas foram observadas quando sistemas híbridos de nanocelulose foram incorporados nos criogéis à base de quitosana (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Como os nanocristais de celulose (CNs) podem atuar tanto como reforços de filmes (MARTELLI-TOSI et al., 2018) quanto associados a partículas à base de quitosana (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020), eles aparecem como uma alternativa a ser utilizada durante o processo de encapsulamento. Alguns estudos indicam a formação de um sistema híbrido com a associação do CN com nanopartículas de quitosana (ALMASI; JAFARZADEH; MEHRYAR, 2018; OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Portanto, o objetivo deste estudo foi produzir criogéis de quitosana e investigar o efeito da incorporação de

sistemas híbridos nanocelulose/quitosana contendo extrato de própolis sobre suas propriedades físico-químicas e mucoadesivas in vitro.

4.2. Material de métodos

4.2.1. Material

A quitosana de massa molecular média (catálogo n. 448877, com grau de desacetilação de 75-85%) foi obtido da Sigma-Aldrich (San Luis, EUA). O ácido acético foi adquirido da Synth (Diadema, São Paulo, Brasil)

4.2.2. Elaboração de criogéis ativos de quitosana contendo compostos ativos encapsulados em TPP-quitossomas e nanocristais de celulose

As partículas de lipossomas, quitossomas e TPP-quitossomas para aplicação nos criogéis foram produzidas de acordo com o procedimento descrito no Capítulo 3. Foi utilizado o extrato de própolis vermelha obtido com 25g de própolis / 100mL de etanol (84,5%) (Tabela 2.2, Capítulo 2).

Os criogéis foram produzidos com a mistura da suspensão de partículas e solução de quitosana (1%), sob agitação magnética por 5 min, então as amostras foram congeladas em nitrogênio líquido (-80 °C) e depois liofilizadas (Liobras, Liotop L101, São Carlos, Brasil). As amostras foram armazenadas em dessecador em temperatura ambiente.

A proporção foi estudada anteriormente e foi utilizada 1:1 (volume de suspensão de partículas : volume de solução de quitosana) (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2022). Foram produzidas seis amostras contendo extrato de própolis vermelha retido nos sistemas de L-PE, Ch-PE, TPPCh-PE, CN-L-PE, CN-Ch-PE, CN-TPPCh-PE.

4.2.3. Caracterização dos criogéis

4.2.3.1. Morfologia

A morfologia dos criogéis foi realizada utilizando Microscopia Eletrônica de Varredura (TM3000, Microscopia de Mesa, Hitachi, Tóquio, Japão). A visualização foi realizada na

superfície dos criogéis, que permaneceram em contato com o ar durante o processo de liofilização.

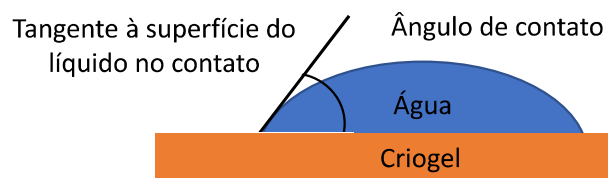
4.2.3.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

As análises de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR-ATR) foram realizadas em um espectrofotômetro (Spectrum-One, Perkin Elmer, Shelton, EUA) com acessório de atenuação de transmitância universal, modelo ATR. Foram realizadas 16 varreduras entre 550 e 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} .

4.2.3.3. Ângulo de contato

O ângulo de contato foi medido utilizando um tensiômetro Attension Theta Lite (KSV Instruments, EUA) de acordo com a metodologia de Silva et al. (2007). Foram analisadas ambos os lados dos criogéis, o lado que ficou em contato com o ar durante o congelamento (Lado A) e o lado que ficou em contato com a placa (Lado P). A determinação do ângulo foi analisada pelo software Attension Theta Lite versão 4.1.9.8 (NIH, EUA) com as imagens digitais. 5,0 μL de água ultrapura foi gotejado no criogel. As imagens foram capturadas após 15, 30 e 60s de deposição e foram utilizadas para calcular o ângulo de contato. A Figura 4.1 apresenta a formação do ângulo de contato.

Figura 4.1. Descrição do ângulo de contato formado pela tangente à superfície do líquido no contato com o criogel.



Fonte: Própria autoria.

4.2.3.4. Mucoadesividade e liberação de flavonoides

A mucoadesividade dos criogéis foram determinadas pela força bioadesiva *in vitro* utilizando um texturômetro TA.XT2 plus (Stable Microsystems SMD, England) com célula de carga de 5 kgf. Essa análise foi realizada de acordo com Brushi et al. (2012), onde foi fixado pele de frango na *probe* de 2,0 cm de diâmetro. A pele foi hidratada com tampão fosfato salino (pH 6,8) à 37 °C por 30 s antes da análise. Então a *probe* comprime o criogel, fixado com fixa adesiva com força constante de 1N por 30 s e são separados com velocidade constante de 0,5 mm/s. A Figura 4.2. apresenta o texturômetro com a pele fixada.

Figura 4.2. Texturômetro com a pele fixada para análise de mucoadesividade.



Fonte: Própria autoria.

A liberação de flavonoides no criogéis com partículas carregadas com PE foi realizado simulando os estágios oral e estomacal utilizando a metodologia descrita por Machado et al. (2022). Os criogéis foram reidratados em água ultra pura para obter uma concentração de 0,01g/mL utilizando agitação magnética.

Para a fase oral, 5g de amostra foi misturada com 4 mL de fluido salivar simulado (SSF), 25 µL de CaCl₂ (3M) e 970 µL de água ultra pura por 2 minutos em banho (Certomat WR, B.Braun, Germany) com agitação de 120 rpm à 37 °C. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e congelada para quantificação de flavonoides.

Para a fase gástrica, foi adicionado 1 mL de solução de pepsina (2000 U/mL na mistura final), 7,6 mL de fluido gástrico simulado, 25 µL de CaCl₂ (3M), HCl para ajustar o pH para 3,0 e água ultra pura. E continuaram no banho com agitação por 2h à 37 °C. Uma alíquota de 0,5 mL foi retirada e congelada para quantificação de flavonoides.

Todas as amostras foram feitas em triplicata, para as duas fases.

A quantificação de flavonoides foi realizada usando espectrometria UV-Vis. As alíquotas foram descongeladas, centrifugadas e o sobrenadante quantificado utilizando a metodologia descrita no Capítulo 2, seção 2.2.2.2. O teor de flavonoides foi determinado de acordo com a curva padrão de quercitina (0 a 0,009 mg/mL): $y = 73,292x - 0,0073$ ($R^2 = 0,9967$). Os resultados foram expressos como mg de quercitina por mL de PE.

4.2.4. Análise estatística

Os dados experimentais (ângulo de contato, mucoadesividade e liberação) foram avaliados utilizando o software XLSTAT (Lumivero, Denver, EUA) por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.3. Resultados e discussão

4.3.1. Testes preliminares

O criogel para teste preliminar foi produzido a partir da mistura de suspensão híbrida descrita por Okamoto-Schalch et al. (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020) sem composto ativo e solução de quitosana 2% (m/v) em diferentes concentrações de acordo com a Tabela 4.1.

Essas amostras foram congeladas em placas de petri num freezer ultra rápido por 40 min, e armazenadas em freezer (-18 °C) por 24h, para então serem liofilizadas por 48 h à 600 mm Hg de vácuo (Terroni, LC1500, São Carlos, Brasil).

Também foram produzidas com a concentração fixa de 0,5 % (m/v) de quitosana, variando, portanto, somente a concentração de partículas. A concentração de cada composto do criogel está descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.1. Composição das amostras de criogel produzidas para avaliação preliminar.

Amostra	Suspensão de partículas (mg/100 mL de criogel)	Solução de quitosana (mg/100 mL de criogel)
A	0	2000
B	56,1	1500
C	112,2	1000
D	168,3	500
E	224,4	0

Fonte: Própria autoria.

Tabela 4.2. Amostras produzidas com concentração de 0,5 % (m/v) de quitosana.

Amostra	Suspensão de partículas (mg/100 mL de criogel)	Solução de quitosana (mg/100 mL de criogel)
F	0	500
G	56,1	500
H	112,2	500
I	168,3	500

Fonte: Própria autoria.

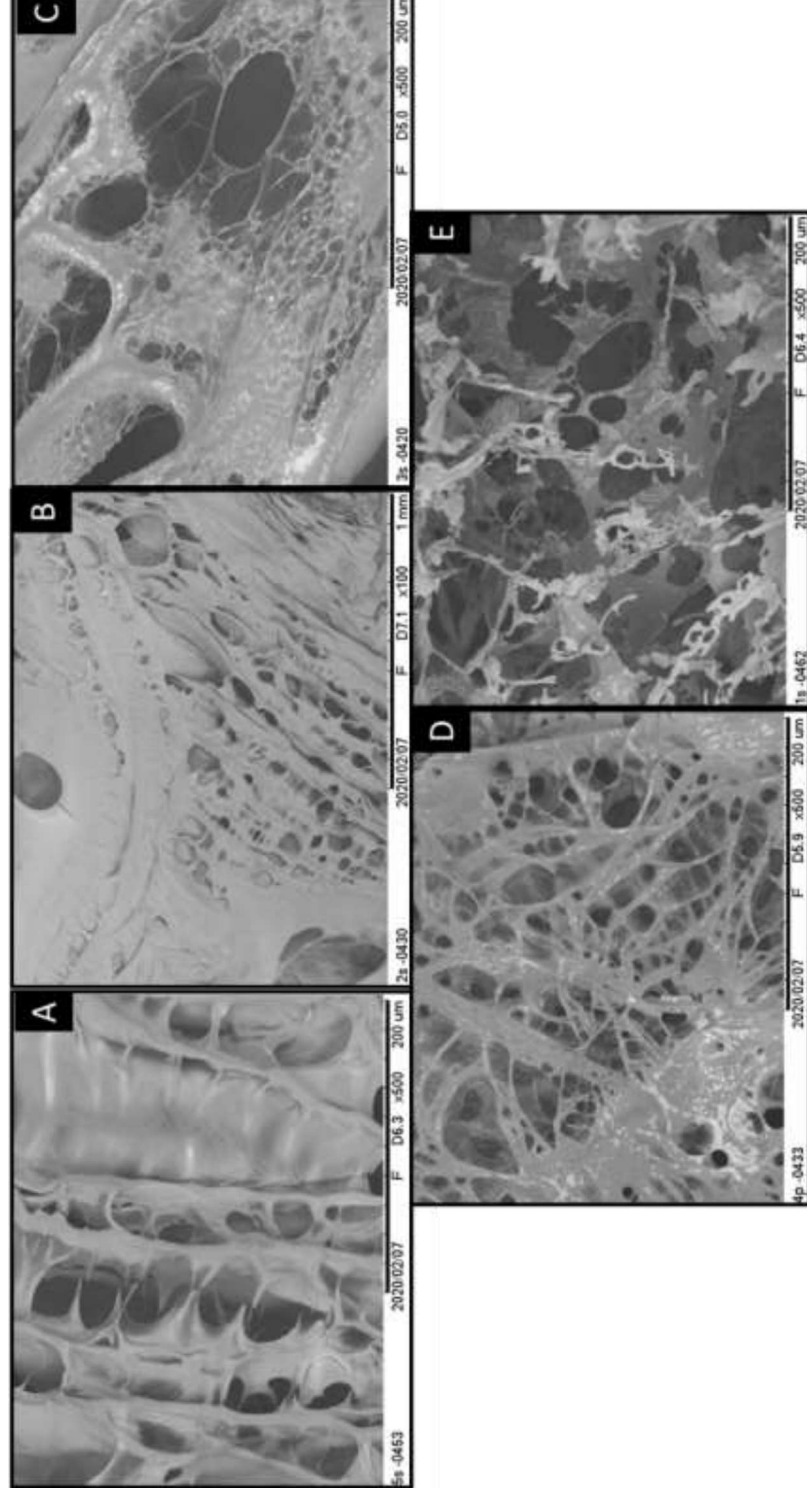
As imagens dos criogéis obtidos podem ser observadas na Figura 4.3. A amostra A que não tinha nanopartícula apresentou uma estrutura mais rígida, mais compactada e com menos poros visíveis (Figura 4.3A). Por outro lado, a amostra E (Figura 4.3E) que continha apenas partículas, sem adição de quitosana, apresentou uma estrutura muito porosa e frágil. As amostras com concentrações intermediárias de sistemas híbridos (amostras B, C e D) apresentaram diferenças visuais pequenas, sendo a amostra com maior concentração de quitosana (amostra B) aquela com estrutura mais rígida.

Figura 4.3. Imagens das amostras de criogéis com diferentes concentrações de partículas e quitosana, conforme Tabela 6. (A) Amostra A (2000 mg de Ch/100 mL de criogel); (B) Amostra B (1500 mg de Ch/100 mL de criogel e 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel); (C) Amostra C (1000 mg de Ch/100 mL de criogel e 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel); (D) Amostra D (500 mg de Ch/100 mL de criogel e 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel) e (E) Amostra E (224,4 mg de partículas/100 mL de criogel).



Fonte: OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Nanocellulose hybrid systems: carriers of active compounds and aerogel/cryogel applications. In: ORAON, R. et al. (Eds.). . **Nanocellulose Materials: Fabrication and industrial Applications**. U.K.: Elsevier Ltd, 2022. p. 330

Figura 4.4. Micrografias das amostras com variação da concentração de quitosana e partículas, conforme Tabela 4.1. (A) Amostra A (2000 mg de Ch/100 mL de criogel); (B) Amostra B (1500 mg de Ch/100 mL de criogel e 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel); (C) Amostra C (1000 mg de Ch/100 mL de criogel e 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel); (D) Amostra D (500 mg de Ch/100 mL de criogel e 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel) e (E) Amostra E (224,4 mg de partículas/100 mL de criogel).



Fonte: OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Nanocellulose hybrid systems: carriers of active compounds and aerogel/cryogel applications. In: ORAON, R. et al. (Eds.). **Nanocellulose Materials: Fabrication and industrial Applications**. U.K.: Elsevier Ltd, 2022. p. 330.

Com a concentração fixa de quitosana no criogel (5 mg/mL), variou-se a concentração de sistemas híbridos de partículas. Pode-se observar na Figura 4.5 que, visualmente, as amostras não apresentaram grandes diferenças. A amostra I (75% de partículas) apresentou uma estrutura menos uniforme na superfície enquanto as demais a superfície era mais lisa.

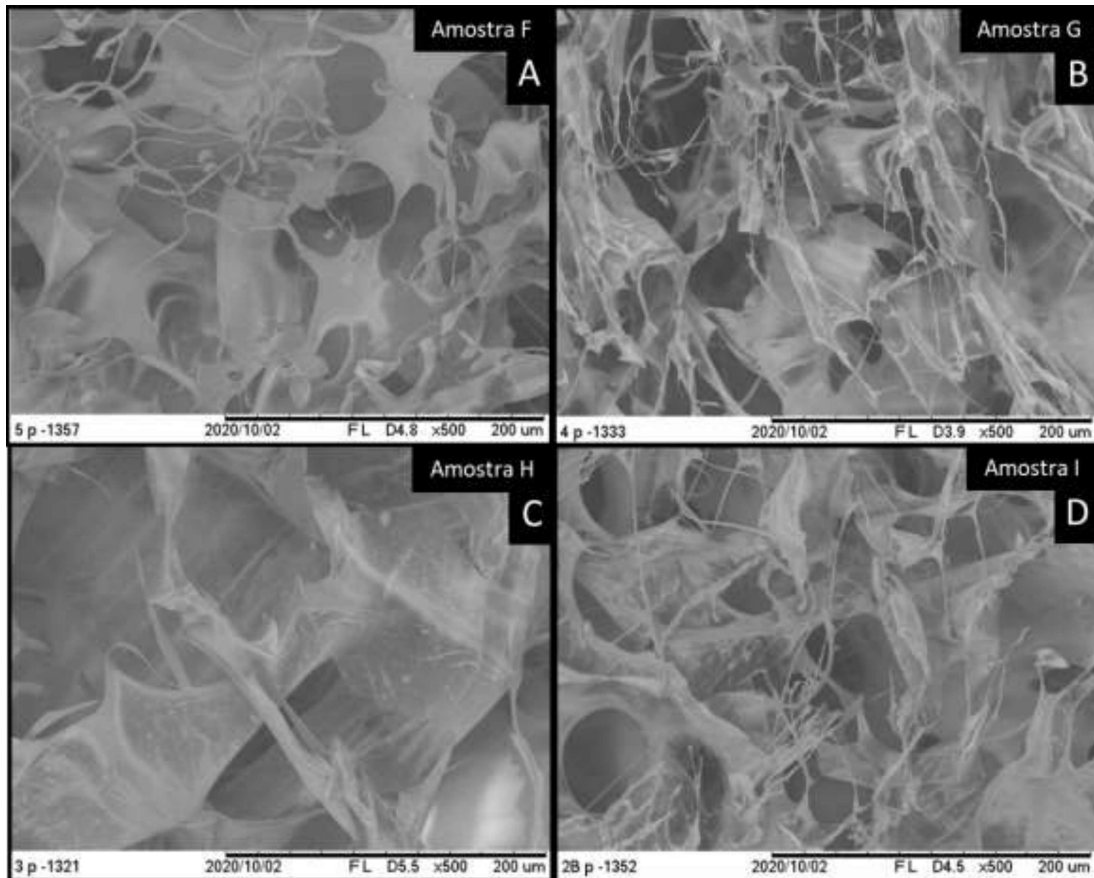
Figura 4.5. Imagens das amostras com concentração de quitosana de 500 mg de quitosana/100 mL de criogel e diferentes concentrações de partículas: (A) 0 (controle, Amostra F), (B) 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra G), (C) 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel (amostra H) e (D) 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra I).



Fonte: Própria autoria.

O tamanho dos poros nos criogéis variaram de acordo com a concentração de partículas colocada. As amostras sem sistemas híbridos adicionados apresentaram tamanho de poros variados com paredes mais espessas (Figura 4.6A) do que os criogéis contendo partículas com concentrações de 56,1 mg de partículas/100 ml de criogel e 168,3 mg de partículas/100 ml de criogel (Figura 4.6B e D, respectivamente). A amostra com 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel parece estar mais homogênea em relação às paredes dos poros (Figura 4.6C), e os poros formados foram maiores do que o controle (Figura 4.6A). O tamanho do poro foi menor para as amostras com 56,1 mg de partículas/100 ml de criogel de partículas.

Figura 4.6. Micrografias das amostras com concentração de quitosana de 500 mg de quitosana/100 mL de criogel e diferentes concentrações de partículas: (A) 0 (controle, Amostra F), (B) 56,1 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra G), (C) 112,2 mg de partículas/100 mL de criogel (amostra H) e (D) 168,3 mg de partículas/100 mL de criogel (Amostra I).

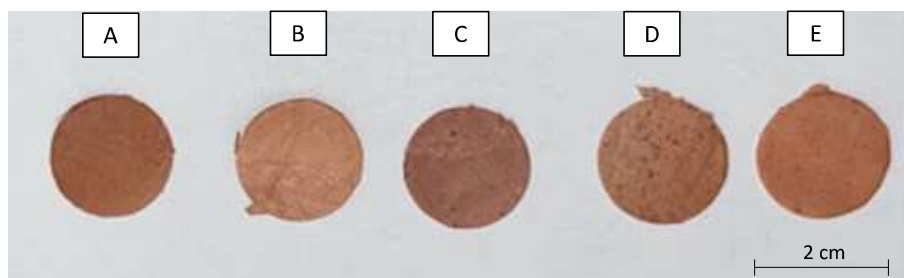


Fonte: Própria autoria

4.3.2. Elaboração dos criogéis

Sabendo dos resultados preliminares, foi possível produzir criogéis à base de quitosana com partículas carregadas de extrato de própolis vermelha. Sendo 1 : 1 (volume de suspensão de partículas : volume de solução de quitosana 2%) A Figura 4.7 apresenta a imagem fotográfica dos criogéis. As amostras contendo lipossomas (L-PE) eram mecanicamente frágeis e não foi possível caracterizar. O criogel com CN-L-PE não apresentou estrutura estável, mas foi mais rígido que a amostra. Portanto, a adição do conteúdo de quitosana (0,15% p/v) nas partículas à base de quitosana (Ch, TPPCh, CN-Ch e CN-TPPCh) é necessária para garantir a manutenção da integridade da amostra após a liofilização.

Figura 4.7. Imagens dos criogéis contendo partículas carregadas de extrato de própolis: (A) Criogel_Ch-PE; (B) Criogel_TPPCh PE; (C) Criogel_CN-L PE; (D) Criogel_CN-Ch PE and (E) Criogel_CN-TPPCh PE



Fonte: Própria autoria

4.3.3. Caracterização dos criogéis

4.3.3.1. Morfologia

As micrografias (MEV) da superfície dos criogéis de quitosana estão apresentadas na Figura 4.8. É uma análise de extrema importância para o estudo dos poros e sua morfologia normalmente depende da técnica de secagem utilizada. De acordo com Chartier et al. (2022), o processo de liofilização produz amostras com poros maiores em comparação aos aerogéis, visto que a liofilização provoca o crescimento de cristais de gelo, resultando em poros maiores em comparação aos aerogéis

A fragilidade dos criogéis contendo lipossomas (L-PE) pode ser explicado pelo tamanho dos poros do criogel que variaram de 10 a 100 μm (Figura 4.8A). O tamanho dos poros foi significativamente maior quando comparados com outros materiais reticulados à base de quitosana produzidos por processo de liofilização. O diâmetro dos poros do material liofilizado depende do formato e tamanho dos cristais de gelo formados no congelamento, eles causam a ruptura dos poros, aumentando o tamanho. Portanto, as características da matéria e a forma em que são congeladas influenciam no tamanho dos poros (NAGHSHINEH; TAHVILDARI; NOZARI, 2019).

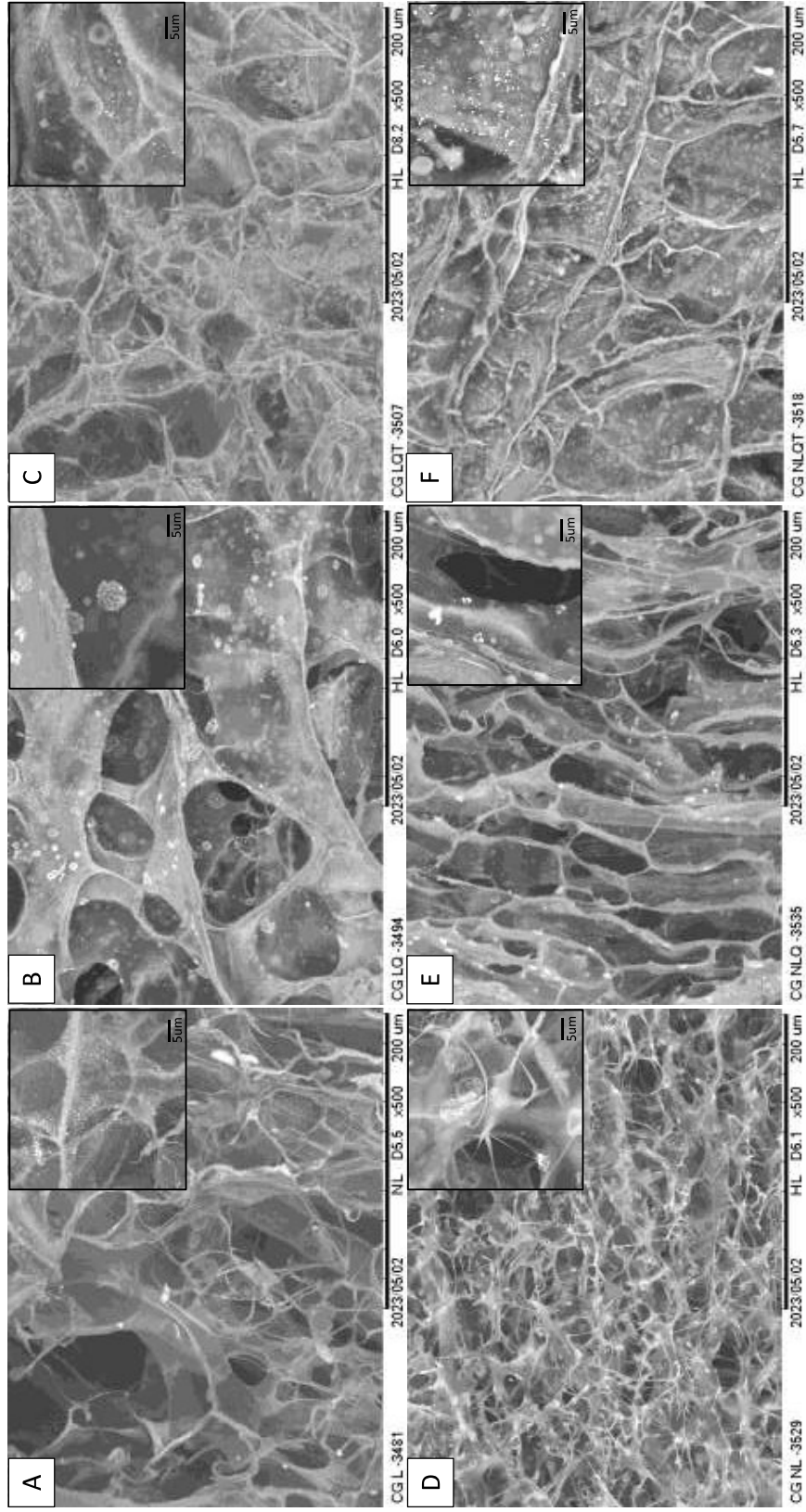
Os tamanhos dos poros nas amostras contendo nanoceluloses foram menores (Figura 4.8D-F), provavelmente devido à rede física formada na presença das fibras e à interação eletrostática entre as nanoceluloses e a quitosana (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Buchtová et al. (2016) também observaram diminuição do tamanho dos poros com o aumento da concentração de celulose nos criogéis, mantendo inalterada a espessura da parede dos poros.

Amostras contendo partículas de TPPCh-PE (Figura 4.8C) apresentaram poros com paredes mais espessas com material em comparação ao Ch-PE (Figura 4.8B), indicando que as partículas produzidas pela gelificação iônica entre quitosana e TPP influenciaram a evaporação da água durante o processo de liofilização e, conseqüentemente, a formação de poros .

As micrografias da Figura 4.8 foram importantes para a observação das partículas carregadas de extrato de própolis. Na Figura 4.8A, é possível observar diversas estruturas circulares com dimensões próximas a 0,5 μm , indicando a presença das partículas incorporadas aos criogéis.

Nas amostras contendo Ch-PE (Figura 4.8B) e TPPCh-PE (Figura 4.8C), as partículas apresentavam formatos circulares maiores, em torno de 5 μm . Outro ponto importante observado na micrografia, foi a presença de formas circulares com manchas escuras ao centro (Figura 4.8C), sugerindo que as partículas estavam carregadas de extrato de própolis. Conforme Lida et al. (2020), esse fato ocorre pela degradação térmica dos compostos ativos orgânicos instáveis durante a exposição ao feixe de elétrons da microscopia.

Figura 4.8. Micrografias (MEV) dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE: (A) Criogel_L-PE; (B) Criogel_Ch-PE ; (C) Criogel_TPPCh-PE ; (D) Criogel_CN-L-PE ; (E) Criogel_CN-Ch-PE ; (F) Criogel_CN-TPPCh-PE.



Fonte: Própria autoria

4.3.3.2. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

Os espectros FTIR dos criogéis estão apresentados na Figura 4.9 considerando o intervalo dos principais grupos vibracionais ($2000 - 500 \text{ cm}^{-1}$). O principal composto do criogel é a quitosana e todas as amostras apresentaram perfil típico de absorbância do polissacarídeo quitosana líquida (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

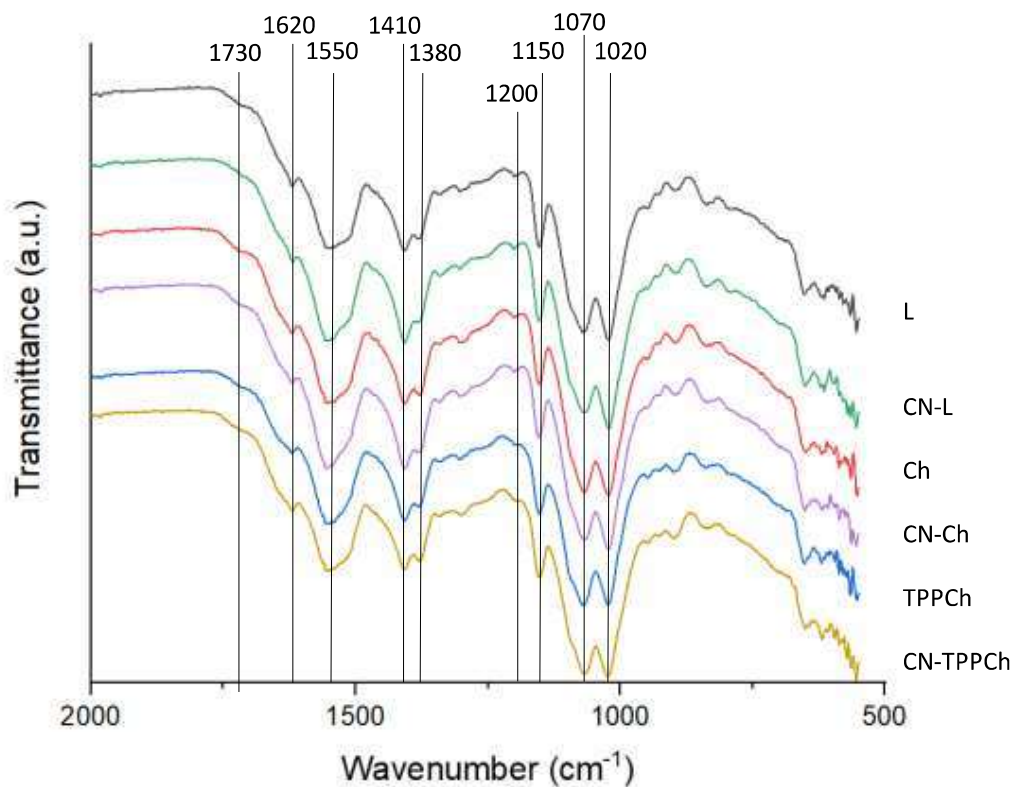
Em 1620 cm^{-1} , a banda indicativa da vibração C=O na carbonila do grupo amida (amida I) foi identificada. O pico intenso em 1550 cm^{-1} foi associado às ligações -NH₂ da amida II. Já a deformação simétrica de CH₃ da quitosana foi observado em 1410 cm^{-1} , enquanto o estiramento de CN foi detectado em 1380 cm^{-1} (amida III) (BARBOSA et al., 2019). Okamoto-Schalch et al. (2020) também relataram a presença de um pico intenso em 1410 cm^{-1} devido à presença de deformação simétrica de CH₃ em sistemas híbridos de nanocristal de celulose.

Já a banda em 1380 cm^{-1} e o ombro em 1100 cm^{-1} estão associados a álcoois secundários e/ou ao grupo éster de estiramento C-O- (OLIVEIRA et al., 2016)

O estiramento C-O do grupo poliálcool encontrado no comprimento de onda 1200 cm^{-1} indica a presença de hidroxiflavonóides, um dos compostos da própolis.

As vibrações C – H e O – H podem ser observadas a 1070 cm^{-1} sugerindo a presença de ligações glicosídicas. A banda intensa centrada em torno de 1020 cm^{-1} é atribuída à contribuição de diversas vibrações associadas às C-O e C-O-C, que compõem a quitosana e a celulose. Essa banda foi mais intensa nas amostras contendo nanoceluloses, principalmente devido à contribuição do estiramento C-O das ligações β-glicosídicas entre as unidades β-D-glucopiranosil na celulose (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020).

Figura 4.9. Espectros FTIR dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE: (A) Criogel_L-PE; (B) Criogel_Ch- PE; (C) Criogel_TPPCh- PE; (D) Criogel_CN-L- PE; (E) Criogel_CN-Ch- PE; (F) Criogel_CN-TPPCh- PE.



4.3.3.3. Ângulo de contato

Na Tabela 4.3 estão apresentados os resultados ângulo de contato dos criogéis adicionados com diferentes sistemas de carregamento de extrato de própolis vermelha.

Os criogéis com lipossomas apresentaram diferença significativa em relação ao ângulo de contato dentro de 60s. Apresentaram os menores ângulos de contato, indicando sua maior afinidade com a água, independente do lado analisado, sendo 84° e 65,5° para o lado A e B, respectivamente e 0° aos 60s para dois lados. Os valores do ângulo aumentaram na amostra com adição de nanocristais de celulose nas partículas de lipossomas (CN-L) no lado P, mas ainda apresenta valores que indicam a hidrofiliabilidade dessas amostras e a maior molhabilidade.

Tabela 4.3. Ângulo de contato dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE, nos tempos 15, 30 e 60 segundos em ambos os lados (lado A, em contato com o ar e lado P em contato com a placa).

Lado	Lado A			Lado P		
	15s	30s	60s	15s	30s	60s
L	84,1 ± 0,4 ^{b c}	67,9 ± 0,5 ^b	0 ± 0 ^c	65,5 ± 18,2 ^b	22,8 ± 32,3 ^b	0 ± 0 ^c
CN-L	70,6 ± 8,2 ^c	56,8 ± 13,5 ^b	33,6 ± 25,6 ^b	83,0 ± 17,1 ^{a b}	74,5 ± 14,1 ^a	66,4 ± 12,3 ^b
Ch	98,9 ± 9,5 ^{a b}	90,0 ± 4,3 ^a	83,8 ± 2,3 ^a	99,4 ± 12,4 ^a	93,3 ± 13,7 ^a	87,1 ± 16,0 ^a
CN-Ch	97,9 ± 14,3 ^{a b}	90,9 ± 8,7 ^a	87,6 ± 8,9 ^a	86,3 ± 3,5 ^{a b}	80,4 ± 3,0 ^a	76,7 ± 6,1 ^{a b}
TPPCh	110,4 ± 16,2 ^a	99,4 ± 10,9 ^a	93,8 ± 7,0 ^a	97,1 ± 4,4 ^a	93,8 ± 5,4 ^a	91,5 ± 5,1 ^a
CN-TPPCh	94,5 ± 4,6 ^{a b}	91,7 ± 3,4 ^a	89,2 ± 8,4 ^a	87,8 ± 4,4 ^{a b}	87,5 ± 4,1 ^a	84,2 ± 5,4 ^{a b}

a, b e c: Média com letra minúscula diferentes na mesma coluna indica diferença significativa entre as amostras de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$.

Entretanto, os criogéis produzidos com partículas à base de quitosana exibiram maiores valores de ângulo de contato, acima de 90° , para ambos os lados do criogel. Os criogéis com sistemas híbridos de nanocristais de celulose apresentaram ângulo de contato menores quando comparados aos criogéis sem CN, embora as diferenças não tenham sido significativas ($p < 0,05$). Os criogéis obtidos apresentaram ângulos de contato semelhantes aos dos criogéis à base de quitosana reticulados com glutaraldeído 2,5% (v/v) ($96,19 \pm 3,22^\circ$), já os reticulados com 7% apresentaram valores maiores ($124,74 \pm 4,21^\circ$) (DINU; GHIMICI; RASCHIP, 2022).

Portanto, a incorporação de partículas à base de quitosana nos criogéis garantiu a sua integridade estrutural, evidenciando sua relevância para aplicações futuras.

4.3.3.4. Mucoadesividade e liberação de flavonoides

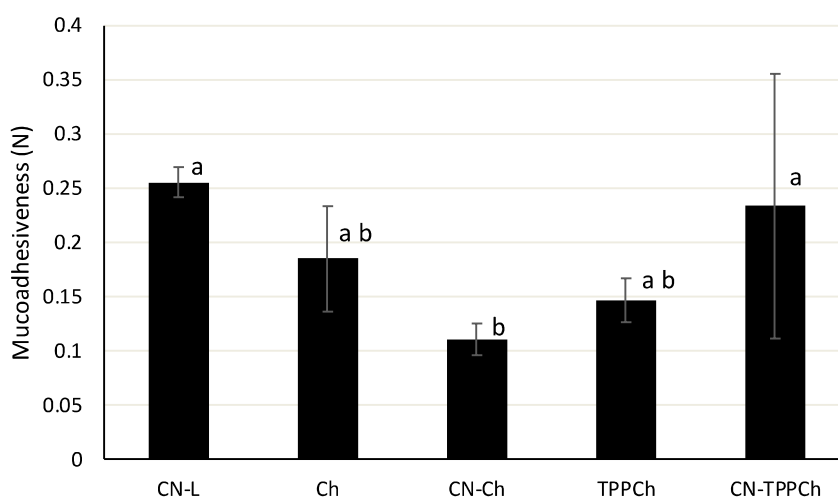
A Figura 4.10 apresenta os valores de resistência bioadesiva dos criogéis, refletindo sua mucoadesividade, com valores de resistência à tração variando de 0,11 a 0,26 N, dependendo do tipo de partícula incorporada. Os criogéis *in situ* precisam exercer alguma força para estabelecer contato com a mucosa oral para a liberação eficaz de bioativos.

As estruturas dos criogéis contendo lipossomas eram frágeis o que impossibilitou a caracterização quanto a mucoadesividade. Entretanto a adição de CNs nas partículas tornou o criogel íntegro e sua resistência à tração foi uma das maiores, 0,26 N. Esse fenômeno também foi observado nos criogéis com partículas de TPPCh, a resistência à tração aumentou de 0,15 N (TPPCh-PE) para 0,23 N (CN-TPPCh-PE). Portanto, observou-se que nestes sistemas, a nanocelulose melhorou a capacidade de gelificação *in situ*. Por outro lado, a mucoadesão foi comprometida no criogéis quando sistemas híbridos CN foram formados com quitossomas, apresentando uma diminuição da resistência de 0,19 N (Ch) para 0,11 N (CN-Ch). Uma explicação plausível é que os sítios de quitosana (NH_3^+) adsorvidos nos lipossomas também podem ter interagido com as nanoceluloses (OKAMOTO-SCHALCH et al., 2020). Consequentemente, os nanocristais de celulose tornaram-se menos acessíveis na superfície dos criogéis e não foram capazes de melhorar a capacidade de gelificação.

Sabendo da bioadesividade do criogel, o estudo do perfil de liberação de flavonoides foi obtido apenas para os sistemas oral e gástrico, visto que essas fases do processo de digestão apresentam concentrações mais baixas de flavonoides, com a mucoadesividade desempenhando um papel crucial. Curiosamente, amostras com maiores valores mucoadesivos exibiram maior liberação de flavonoides no fluido oral simulado: Criogel_CN-L- PE ($18,8 \pm 2,1 \mu\text{g}$ quercetina/mL de suspensão), seguido por Criogel_Ch- PE ($13,5 \pm 6,4 \mu\text{g}$ quercetina/mL de

suspensão), Criogel_CN-TPPCh- PE ($11,3 \pm 0,9$ μg quercetina/mL de suspensão), Criogel_CN-Ch- PE ($10,9 \pm 2,0$ μg quercetina/mL de suspensão) e Criogel_TPPCh-PE ($9,5 \pm 1,0$ μg quercetina/mL de suspensão). Não foram observadas diferenças significativas em relação à liberação gástrica de flavonoides, onde liberam cerca de 290 μg de quercetina/mL de suspensão.

Figura 4.10. Ângulo de contato dos criogéis adicionadas de diferentes partículas carregadas de PE, nos tempos 15, 30 e 60 segundos em ambos os lados (lado A, em contato com o ar e lado P em contato com a placa): (A) Criogel_L-PE; (B) Criogel_Ch- PE; (C) Criogel_TPPCh- PE; (D) Criogel_CN-L- PE; (E) Criogel_CN-Ch- PE; (F) Criogel_CN-TPPCh- PE.



a, b e c: Média com letra minúscula diferentes na mesma coluna indica diferença significativa entre as amostras de acordo com o teste de Tukey, $p < 0,05$.

4.4. Conclusão

As partículas adicionadas no criogel influenciaram significativamente as propriedades do mesmo, potencializando seu uso em diversas aplicações. Os criogéis contendo apenas lipossomas (Criogel_L-PE) exibiram integridade mecânica inadequada, tendo poros maiores e maior hidrofiliçidade. Entretanto a adição de nanocristais de celulose, mostrou uma melhora estrutural dos criogéis (Criogel_CN-L) com mucoadesividade *in situ* aprimorada e liberação de flavonoides evidenciada. Em contraste, o Criogel_Ch-PE e Criogel_TPPCh-PE apresentaram tamanhos de poros menores, molhabilidade reduzida e um perfil de liberação de flavonoides mais baixo. Estas partículas normalmente oferecem maior estabilidade e podem melhorar a liberação controlada dos bioativos. Considerando estas descobertas, a incorporação de sistemas

híbridos contendo nanocristais de celulose poderia ser altamente benéfica para permitir o uso de criogéis à base de lipossomas.

REFERÊNCIAS

- ALMASI, H.; JAFARZADEH, P.; MEHRYAR, L. Fabrication of novel nanohybrids by impregnation of CuO nanoparticles into bacterial cellulose and chitosan nanofibers: Characterization, antimicrobial and release properties. **Carbohydrate Polymers**, v. 186, p. 273–281, 15 abr. 2018.
- BARBOSA, H. F. G. et al. A new look towards the thermal decomposition of chitins and chitosans with different degrees of deacetylation by coupled TG-FTIR. **Carbohydrate Polymers**, v. 225, p. 115232, 1 dez. 2019.
- BÖLGEN, N. et al. Development of Hypericum perforatum oil incorporated antimicrobial and antioxidant chitosan cryogel as a wound dressing material. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 1581–1590, 15 out. 2020.
- BRUSCHI, M. L. et al. Semisolid Systems Containing Propolis for the Treatment of Periodontal Disease: In Vitro Release Kinetics, Syringeability, Rheological, Textural, and Mucoadhesive Properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 7, p. 2271–2280, 2012.
- BUSCH, V. M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227–235, 2017.
- CHARTIER, C. et al. Tuning the properties of porous chitosan: Aerogels and cryogels. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 202, n. October 2021, p. 215–223, 2022.
- DINU, I. A.; GHIMICI, L.; RASCHIP, I. E. Macroporous 3D Chitosan Cryogels for Fastac 10EC Pesticide Adsorption and Antibacterial Applications. **Polymers**, v. 14, n. 15, 2022.
- GANESAN, K. et al. Design of aerogels, cryogels and xerogels of cellulose with hierarchical porous structures. **Materials and Design**, v. 92, p. 345–355, 15 fev. 2016.
- GOMES SÁ, S. H. et al. Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. **Food Research International**, v. 164, p. 112423, fev. 2023.
- IIDA, A. S. L. et al. Investigation of TPP-Chitosomes particles structure and stability as encapsulating agent of cholecalciferol. **Polimeros**, v. 29, n. 4, p. 1–8, 2020.
- MACHADO, A. R. et al. Alginate Particles for Encapsulation of Phenolic Extract from *Spirulina* sp. LEB-18: Physicochemical Characterization and Assessment of In Vitro Gastrointestinal Behavior. **Polymers**, v. 14, n. 21, p. 4759, 6 nov. 2022.
- MARTELLI-TOSI, M. et al. Soybean straw nanocellulose produced by enzymatic or acid treatment as a reinforcing filler in soy protein isolate films. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 61–68, out. 2018.
- NAGHSHINEH, N.; TAHVILDARI, K.; NOZARI, M. Preparation of Chitosan, Sodium Alginate, Gelatin and Collagen Biodegradable Sponge Composites and their Application in

Wound Healing and Curcumin Delivery. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 27, n. 12, p. 2819–2830, 2019.

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Production and characterization of chitosan-TPP/cellulose nanocrystal system for encapsulation: a case study using folic acid as active compound. **Cellulose**, v. 27, n. 10, p. 5855–5869, 2020.

OKAMOTO-SCHALCH, N. O. et al. Nanocellulose hybrid systems: carriers of active compounds and aerogel/cryogel applications. In: ORAON, R. et al. (Eds.). **Nanocellulose Materials: Fabrication and industrial Applications**. U.K.: Elsevier Ltd, 2022. p. 330.

OLIVEIRA, R. 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)scielo , , 2016.

ROLLINI, M. et al. Propolis and chitosan as antimicrobial and polyphenols retainer for the development of paper based active packaging materials. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 14, p. 75–82, 1 dez. 2017.

SHAKOURY, N. et al. Encapsulation of propolis extract in whey protein nanoparticles. **LWT**, v. 158, p. 113138, 15 mar. 2022.

SILVA, W. A. DA et al. Determinação da cor, imagem superficial topográfica e ângulo de contato de biofilmes de diferentes fontes de amido. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 1, p. 154–163, fev. 2007.

TAVARES, L. et al. Propolis : Encapsulation and application in the food and pharmaceutical industries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 127, n. April, p. 169–180, 2022.

ZHANG, F. et al. Temperature-sensitive poly-NIPAm modified cellulose nanofibril cryogel microspheres for controlled drug release. **Cellulose**, v. 23, n. 1, p. 415–425, 2016.

ZHANG, H. et al. Control of ice crystal growth and its effect on porous structure of chitosan cryogels. **Chemical Engineering Science**, v. 201, p. 50–57, 29 jun. 2019.

CAPÍTULO 5 . CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível extrair altas concentração de flavonoide e CFTs da própolis vermelha originária de Alagoas, Brasil. Essas propriedades foram confirmadas pelos altos valores de capacidade antioxidante, tanto ABTS como FRAP. De acordo com a análise estatística realizada, a concentração de CFTs e flavonoides foi significativamente diferente para a massa de própolis, sendo a concentração a concentração de 25 g de própolis/100 mL de solvente a amostra com maiores valores.

As partículas controle L foram em escala nanométrica e os sistemas híbridos contendo CNs foram micrométricos. As partículas contendo PE do ponto ótimo apresentaram maiores diâmetros, sugerindo que houve a encapsulação dos compostos ativos. Os valores de potencial zeta confirmaram a formação de quitossomas, visto que os valores inverteram de negativo em L para positivo em Ch, aumentando assim a estabilidade das partículas.

Quando os sistemas híbridos foram incorporados nos criogéis, observou-se a influência nas propriedades do mesmo, potencializando seu uso em diversas aplicações. Os criogéis contendo apenas lipossomas (Criogel_L-PE) exibiram integridade mecânica inadequada, apresentando poros maiores e maior hidrofobicidade. Por outro lado, a adição de nanocristais de celulose, mostrou uma melhora estrutural dos criogéis (Criogel_CN-L) com mucoadesividade *in situ* aprimorada e liberação de flavonoides evidenciada. Em contrapartida, o Criogel_Ch-PE e Criogel_TPPCh-PE apresentaram tamanhos de poros menores, molhabilidade reduzida e um perfil de liberação de flavonoides mais baixo. Estas partículas normalmente apresentam maior estabilidade e podem melhorar a liberação controlada dos bioativos. Dada esta nova compreensão, a incorporação de sistemas híbridos que incluem nanocristais de celulose em criogéis pode representar uma solução altamente vantajosa para viabilizar a aplicação de criogéis com base em lipossomas.

Como perspectivas para trabalhos futuros, podemos citar:

- avaliação biológica das partículas;
- aplicação dos criogéis em tecidos celulares *in vitro* e *in vivo* para avaliar a eficácia do extrato encapsulado e toxicidade;
- aplicação dos sistemas híbridos para encapsulação de outros compostos de interesse;
- verificar a viabilidade de coencapsulação de compostos de diferentes polaridades no sistema híbrido, bem como sua liberação controlada e digestibilidade *in vitro*.