

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA HOCHHEIM

INCORPORAÇÃO DE PRÓPOLIS EM NANODISPOSITIVOS BIOPOLIMÉRICOS
VISANDO À APLICAÇÃO BIOMÉDICA

CURITIBA

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SABRINA HOCHHEIM

INCORPORAÇÃO DE PRÓPOLIS EM NANODISPOSITIVOS BIOPOLIMÉRICOS
VISANDO À APLICAÇÃO BIOMÉDICA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, no setor de Ciências Exatas, na Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Izabel C. Riegel Vidotti
Coorientadores: Prof.^a Dr.^a Carolina Camargo de Oliveira
Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Área de concentração: Físico-Química

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Hochheim, Sabrina

Incorporação de própolis em nanodispositivos biopoliméricos visando à aplicação biomédica. / Sabrina Hochheim. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Izabel Cristina Riegel Vidotti Miyata.

Coorientadores: Prof^a Dr^a Carolina Camargo de Oliveira e Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva.

1. Própolis. 2. Biocompatibilidade. 3. Alginatos. I. Miyata, Izabel Cristina Riegel Vidotti. II. Oliveira, Carolina Camargo de. III. Silva, Bruno José Gonçalves da. IV. Universidade Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Química. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -
40001016026P2

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **SABRINA HOCHHEIM** intitulada: **INCORPORAÇÃO DE PRÓPOLIS EM NANODISPOSITIVOS BIOPOLIMÉRICOS VISANDO À APLICAÇÃO BIOMÉDICA**, sob orientação da Profa. Dra. IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 24 de Janeiro de 2023.

Assinatura Eletrônica

25/01/2023 17:05:45.0

IZABEL CRISTINA RIEGEL VIDOTTI MIYATA

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

04/02/2023 10:10:18.0

PAULO VITOR FARAGO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

27/01/2023 08:52:31.0

LIZANDRA MARIA ZIMMERMANN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE REGIONAL DE BLUMENAU)

Assinatura Eletrônica

26/01/2023 10:20:29.0

DANIELA FLORÊNCIO MALUF

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

01/02/2023 10:06:44.0

SÔNIA FARIA ZAWADZKI

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

CENTRO POLITÉCNICO - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-3006 - E-mail: cpgquim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal [Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015](#).

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 250765

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 250765

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pela força e motivação que Ele me deu todos os dias ao acordar e embarcar na jornada de pesquisa acadêmica, e assim, cumprir parte do meu propósito de vida.

À minha orientadora Izabel, por toda ajuda, incentivo desde o dia em que nos conhecemos em Blumenau – SC. Por se mostrar uma orientadora, humana acima de tudo, que compreende minhas fraquezas e sempre me incentiva a continuar. Por sempre demonstrar o orgulho que ela sente de todos os seus filhos científicos. E pela amizade dentro e fora do laboratório.

À minha coorientadora Carolina por todos os ensinamentos que me passou, por todas as aulas extrassala que eu tive. Por se mostrar uma amiga e incentivadora e pelo seu ânimo contagiante. Pelos passeios turísticos em Lecce – Itália, durante meu doutorado sanduíche.

Ao meu coorientador Bruno José, sempre disposto a me auxiliar na melhora do meu trabalho, com todo auxílio em relação aos cromatogramas e demais assuntos.

À Loretta del Mercato e toda sua equipe do CNR-Nanotec por terem me recebido em seu laboratório e por toda contribuição durante meu doutorado sanduíche em Lecce - Itália.

Aos colegas de laboratório GPMIn e ao professor Marcio Vidotti: foram muitas horas de dúvidas tiradas, trocas de experiência e vivências laboratoriais, as quais com certeza, tornaram meu trabalho melhor. Ao colega Bruno Campos da Silva que me auxiliou dando muitas ideias no início do meu doutorado.

Aos colegas do laboratório de Biologia Celular: à professora Fernanda Simas por sua imensa colaboração com meu trabalho e por todo ensinamento passado. Aos colegas Jennifer Pendiuk Gonçalves, Stellee Biscaia, Daniel Bellan e Anderson Fraga da Cruz pela ajuda prática na rotina do laboratório de cultivo celular.

Ao professor Cyro Saul Ketzer pela disponibilização do seu equipamento de *electrospinning* que me permitiu terminar o trabalho com as nanofibras.

Ao professor Caio M. M. Cordova, por ter, gentilmente, continuado a me ceder a própolis mesmo após o término do meu mestrado. À professora Lizandra Zimmermann por ter me recebido na FURB – Blumenau, e me auxiliado nas análises de DLS e potencial Zeta. Ao professor Ismael Casagrande Bellettini da UFSC – Blumenau, pelas análises de FTIR.

A todos os demais colegas, laboratórios e seus responsáveis que foram muito importantes para meu trabalho multidisciplinar: à Naiara pelo auxílio nas análises de GC-MS. LCE – laboratório de Cromatografia e Espectrometria de massas (Flavia Lada

Degaut Pontes e Keylla Lençone Mischiatti), Laboratório do Professor Dr. Marcio Peres de Araújo e CEPESQ - Centro de Pesquisa em Química Aplicada (Jéssica Thais de Lima).

À minha banca avaliadora da qualificação e/ou defesa de doutorado: Daniela Maluf, Sônia Faria Zawadzki, Cyro Ketzer Saul, Lizandra Zimmermann e Paulo Vitor Farago por todas as contribuições que tornaram esse trabalho ainda mais completo.

Ao CME - UFPR pelas imagens de microscopia eletrônica que tornaram meu trabalho lindamente ilustrado.

À CAPES pela bolsa de estudos e a CAPES-PRInt pela bolsa de doutorado sanduíche.

Aos meus amigos que sempre se mostraram interessados e vibraram com minhas conquistas e ao meu namorado Wandler Ferraz, por todo carinho e amor e por ter me ensinado a cuidar da minha saúde mental durante esses anos.

E por fim, à minha família, que foi um verdadeiro porto seguro, durante essa jornada e que me reabastecia de energia toda vez que eu os visitava em Timbó - SC. Sem o amor deles eu jamais teria conseguido.

Muito Obrigada!

*“Sempre permaneça aventureiro.
Por nenhum momento se esqueça de que
a vida pertence aos que investigam.
Ela não pertence ao estático;
Ela pertence ao que flui.
Nunca se torne um reservatório,
sempre permaneça um rio.”*

Osho.

RESUMO

A própolis é uma substância resinosa produzida pelas abelhas a partir de exsudatos que elas coletam de plantas. Devido às suas atividades curativas, a própolis é utilizada desde a civilização antiga até hoje, e ocupa um lugar de destaque dentre os produtos naturais. Um dos problemas da própolis é a sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que dificulta o seu aproveitamento terapêutico. Nesta tese de doutorado foram desenvolvidos nanodispositivos (nanofibras e nanogéis) para incorporação de própolis, melhorando assim a sua biodisponibilidade. Foi estudado e utilizado um extrato de própolis (EP) obtido com diclorometano, com a finalidade de concentrar sua fração apolar, rica em compostos terpênicos, responsáveis pelo odor agradável da própolis. No EP, através da técnica de GC-MS foi possível identificar 27 moléculas pertencentes à classe dos terpenos. A concentração inibitória média (IC₅₀ da própolis foi determinada utilizando testes in vitro de vermelho neutro (VN) e cristal violeta (CV). Para as células Balb/3T3 a IC₅₀ foi de 61,78 µg mL⁻¹ e para as células B16-F10 a IC₅₀ foi de 36,15 µg mL⁻¹. Assim, pôde-se estabelecer concentrações seguras da fração de própolis que foram utilizadas nos ensaios de migração celular (*scratch assay*). Na concentração de 15 µg mL⁻¹, a própolis provou interferir na migração de células B16-F10, enquanto para células Balb/3T3 não foram vistas diferenças em relação aos controles utilizados. Na segunda parte desse trabalho foram desenvolvidas nanofibras utilizando zeína e própolis pela técnica de *electrospinning*. A zeína é um biopolímero proteico que possui muitos sítios hidrofóbicos, ideais para a encapsulação de ativos de baixa polaridade como a própolis. Assim, foram feitas caracterizações físico-químicas que evidenciaram a boa interação entre os materiais. Isso favoreceu a obtenção de fibras em tamanhos nanométricos, que passaram por tratamento térmico para a sua estabilização (*annealing*) e em seguida, foram completamente caracterizadas. As fibras foram feitas inicialmente com zeína a 30% (m/v) em etanol 90% (v/v) (z30) e após, diferentes concentrações de própolis (5 a 25% m/m) foram adicionadas às soluções de partida (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25). Em seguida, as fibras foram testadas quanto à sua biocompatibilidade utilizando os ensaios de MTT e VN frente às células Balb/3T3 e B16-F10. As fibras provaram ser compatíveis com as células Balb/3T3 até a concentração de própolis de 20% (z30p20). Já para as células B16-F10 a partir da concentração de 10% (z30p10) houve um decaimento significativo na viabilidade celular. O desenvolvimento das fibras mostrou-se bastante promissor para pesquisas subsequentes quanto à atividade antitumoral desse material. Na terceira parte desse trabalho foi desenvolvido um nanogel de alginato de sódio reticulados com Zn²⁺ para encapsulação do EP. Previamente, o alginato de sódio comercial foi caracterizado por HPSEC e RMN. A técnica de RMN evidenciou maior quantidade de blocos M e assim foi possível otimizar as condições de síntese do nanogel. O tamanho das partículas obtidas ficou em torno de 200 nm e foi possível encapsular cerca de 80% da própolis inicial adicionada à síntese. O perfil de liberação da própolis a partir do nanogel foi estudado em meios com diferentes valores de pH. Foi possível perceber que o EP, devido ao inchamento das cadeias do alginato, tem sua liberação facilitada em meio de pH 7,4. Em meio ácido, a própolis tende a ficar, em parte, retida no nanogel, provavelmente devido à capacidade de gelificação e contração das cadeias do alginato em meio ácido, o que dificulta a sua saída. Esses ensaios provam a capacidade do nanogel de alginato em servir como uma plataforma para liberação programada de ativos. Com esse trabalho foi possível caracterizar o EP e comprovar as suas atividades terapêuticas. Através do entendimento físico-químico sobre a interação entre a própolis e os biopolímeros utilizados, foram desenvolvidos nanodispositivos capazes de fazer a liberação programada da própolis e assim, aumentar a sua biodisponibilidade.

Palavras-chave: própolis, biocompatibilidade, antitumoral, nanofibras, *electrospinning*, zeína, nanogel, alginato de sódio.

ABSTRACT

Propolis is a resinous substance produced by bees from the exudates they collect from plants. Because of its healing activities, propolis has been used since ancient civilization to these days and occupies a prominent place among natural products. One of propolis problems is its low solubility in aqueous medium, which hinders its therapeutic use. In this PhD thesis it was developed nanodevices (nanofibers and nanogels) for propolis incorporation, thus improving its bioavailability. It was studied and used a propolis extract (EP) obtained with dichloromethane, to concentrate its apolar fraction, rich in terpenic compounds, responsible for propolis pleasant odor. By GC-MS technique it was possible to identify 27 molecules belonging to the terpene class in PE. Propolis mean inhibitory concentration (IC_{50}) was determined by neutral red (VN) and crystal violet (CV) *in vitro* tests. The IC_{50} for Balb/3T3 cells was $61.78 \mu\text{g mL}^{-1}$ and for B16-F10 cells was $36.15 \mu\text{g mL}^{-1}$. Thus, it was possible to establish safe propolis concentrations that were used in the cell migration assays (scratch assay). At the concentration of $15 \mu\text{g mL}^{-1}$, propolis proved to interfere with B16-F10 cell migration, while for Balb/3T3 cells no differences were observed compared to control. In the second part of this work, nanofibers were developed using zein and propolis by the electrospinning technique. Zein is a protein biopolymer that has many hydrophobic sites, ideal for encapsulation of low polarity actives such as propolis. Thus, physicochemical characterizations showed good interaction between these materials. This favored nano-sized fibers obtention, which underwent thermal treatment for stabilization (annealing) and then were fully characterized. Fibers were first produced with 30 wt% pure zein in 90% (v/v) ethanol (z30) and then different propolis concentrations (5 to 25 wt%) were added to the starting solutions (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 and z30p25). The fibers were then tested for biocompatibility using MTT and VN assays against Balb/3T3 and B16-F10 cells. The fibers proved to be compatible with Balb/3T3 cells up to 20% propolis concentration (z30p20). For B16-F10 cells, at 10% concentration (z30p10) there was a significant decrease in cell viability. The fibers development was very promising for further research on this material antitumor activity. In the third part of this work, a Zn^{2+} cross-linked sodium alginate nanogel was developed to encapsulate PE. Previously, the commercial sodium alginate was characterized by HPSEC and NMR. The NMR technique showed a higher content of M-blocks and thus it was possible to optimize the nanogel synthesis conditions. The obtained particle size was around 200 nm, and it was possible to encapsulate about 80% of the initial propolis added to the synthesis. Propolis release profile from nanogel was studied in media with different pH. It was possible to observe that the PE, due to alginate chains swelling, had its release facilitated in pH 7.4 medium. In acidic medium, propolis tends to be partly retained in the nanogel, probably due to alginate chains gelling and shrinking capacity in acidic medium, which hinders its exit. These tests proved the alginate nanogels capacity to serve as a platform for actives programmed release. With this work it was possible to characterize the PE and prove its therapeutic activities. Through the physicochemical understanding of propolis and biopolymers interaction, nanodevices capable of propolis programmed release increasing its bioavailability were developed.

Keywords: propolis, biocompatibility, antitumor, nanofibers, electrospinning, zein, nanogel, sodium alginate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estruturas químicas dos compostos fenólicos encontrados na própolis	16
Figura 2 Terpenos encontrados na própolis	17
Figura 3 Imagens ilustrativas da própolis e abelha <i>Melipona quadrifasciata</i>	17
Figura 4 Aminoácidos apolares de maior abundância presentes na fração zeína	23
Figura 5 Estrutura química da fração α -zeína	24
Figura 6 Espectro de dicroísmo circular A. diferentes estruturas proteicas secundárias e B. zeína a 2 mg mL^{-1} solubilizada em etanol 90%.	25
Figura 7: Estrutura molecular do Alginato: G = ácido α -L-gulurônico (GulpA), M = ácido β -D-manurônico (ManpA), unidas por ligação 1,4-glicosídicas.....	26
Figura 8: Estrutura egg-box do alginato: formação de ligações coordenadas entre o Ca^{2+} e os grupos carboxilatos do alginato.	27
Figura 9 Representação esquemática da técnica de electrospinning.	28
Figura 10 A. O fenômeno natural da Instabilidade de Plateau-Rayleigh:.....	29
Figura 11 Curva analítica obtida com diversas concentrações de própolis em diclorometano.	42
Figura 12. Cromatogramas obtidos por GC-MS da própolis.....	49
Figura 13 Moléculas de maior área relativa identificadas por GC-MS na própolis.....	51
Figura 14 Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de própolis. Determinação em células A. Balb/3T3 e B. B16-F10.	52
Figura 15 IC_{50} . IC_{50} da própolis frente a linhagem A. Balb/3T3 e B. B16-F10 calculadas a partir do ensaio de viabilidade celular com vermelho neutro.	53
Figura 16 Densidade Celular após tratamento com diferentes concentrações de própolis. Determinação em células A. Balb/3T3 e B. B16-F10	54
Figura 17 Migração Celular. A. células Balb-3T3 e B. Células B16-F10.....	55
Figura 18 Migração celular. Imagens representativas do acompanhamento do ensaio de migração celular das células Balb/3T3 feito em microscópio óptico invertido	56
Figura 19 Migração celular. Imagens representativas do acompanhamento do ensaio de migração celular das células B16-F10 feito em microscópio óptico invertido	57
Figura 20 Curva de viscosidade das soluções de partida do electrospinning.	59
Figura 21 Espectro de dicroísmo circular	59
Figura 22 Tensão superficial das soluções de zeína 30% (z30) em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90% (v/v) a 25°C	61
Figura 23 Imagens de Microscopia eletrônica de varredura das amostras	63
Figura 24 Diâmetro das fibras de zeína eletrofiadas nas concentrações de zeína 25 e 30% e em 70 e 90% de etanol.	64
Figura 25 Microscopia eletrônica de varredura e distribuição de tamanho do diâmetro das fibras após o annealing a 160°C por 4 h.	65
Figura 26 Espectro de infravermelho da própolis obtido por FTIR-ATR.	67
Figura 27 Espectro de FTIR da zeína em pó e das nanofibras obtidas somente com zeína (z30)	68

Figura 28 Espectro de FTIR com as nanofibras de zeína crescidas de própolis (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20, z30p25).....	69
Figura 29 Representação esquemática da molhabilidade de um líquido sobre uma superfície sólida.....	70
Figura 30 Ângulo de contato formado entre a água ultrapura e as fibras.	71
Figura 31 Calorimetria exploratória Diferencial (DSC).....	73
Figura 32 Concentração de própolis extraída das fibras de antes e depois do <i>annealing</i>	75
Figura 33 Esquema de redução do MTT para o Azul de formazan	76
Figura 34 Ensaio de MTT com células Balb/3T3 sobre as fibras feitas com zeína pura. ..	77
Figura 35 Imagens de microscopia óptica das Células Balb/3T3 cultivadas sobre as fibras	77
Figura 36 Ensaio de biocompatibilidade das fibras frente as células Balb/3T3 A. ensaio de MTT e B: ensaio de vermelho neutro.	79
Figura 37 Imagens de MEV para acompanhamento do ensaio de biocompatibilidade das células Balb/3T3	80
Figura 38 Esquema representativo da interação entre as células e as fibras.	81
Figura 39 Ensaio de biocompatibilidade das fibras frente as células B16-F10 A. ensaio de MTT e B: ensaio de vermelho neutro.	82
Figura 40 Imagens de microscopia óptica das células B16-F10 cultivadas sobre A: z30, B: z30p5, C: z30p10, D: z30p15, E: z30p20 e F: z30p25	83
Figura 41 Imagens de MEV das células B16-F10 para acompanhamento do ensaio de citotoxicidade.....	84
Figura 42 Perfil cromatográfico obtido por HPSEC da amostra de alginato de sódio.	85
Figura 43 Espectro de ¹ H RMN da amostra de alginato de sódio – região anomérica juntamente com a representação das regiões referentes a cada hidrogênio dos monômeros G e M.	86
Figura 44 A. Imagem de MET obtida do nanogel reticulado com zinco A e B. sem própolis e C e D preenchido com própolis	89
Figura 45 Imagens de MEV obtidas com o nanogel contendo própolis.	89
Figura 46 Espectro de FTIR-ATR obtidos com o alginato de sódio e do nanogel com própolis e sem própolis.	90
Figura 47 Fotos sob luz ultravioleta (A-D):	92
Figura 48 Perfil de liberação da própolis em tampão 7,4 e 5,3 ao longo do tempo a partir do nanogel reticulado com Zn ²⁺	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas de Terpenos identificadas no extrato de própolis por GC-MS.....	50
Tabela 2. Densidade das soluções de zeína 30% (z30) e zeína com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90 (v/v) a 25°C.....	60
Tabela 3. Potencial Zeta das dispersões de zeína 30%(z30) e zeína com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90% (v/v) a 25°C.....	61
Tabela 4. Ângulos de contato a direito (D) e a esquerda (E) formados entre a água ultrapura e as fibras feitas com zeína 30%(z30) e zeína com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90 (v/v) a 25°C antes e depois do annealing feito em diferentes condições.....	71
Tabela 5. Variação de entalpia de fusão nas amostras submetidas ao DSC	73
Tabela 6. Quantidade de própolis incorporada/extraída das fibras depositadas em lamínulas de área de 4 cm ² e a proporção calculada para a deposição numa lamínula redonda de 1,32 cm ² . Os resultados estão expressos em µg por cm ²	75
Tabela 7. Incremento de índice de refração (dn/dc), massa molar do alginato de sódio (Mw, Mn) e índice de dispersão obtidos (Đ) pela técnica HPSEC.....	85
Tabela 8. Acompanhamento do tamanho e carga superficial das partículas obtidas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 ao longo do tempo de 24 dias como forma de avaliar a formação e a estabilidade do nanogel em meio aquoso.....	87
Tabela 9. Acompanhamento do tamanho, por intensidade de luz espalhada, e carga superficial das partículas obtidas no equipamento ZetaSizer Nano ZS (FURB) em triplicata.....	88
Tabela 10. Dados experimentais da eficiência de encapsulação da própolis obtidos com a síntese do nanogel feita em triplicata	91
Tabela 11. Modelos cinéticos e os parâmetros obtidos pela liberação da própolis a partir do nanogel. São apresentados os valores de R ² de cada modelo: primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.....	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GC-MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
HPLC-ESI-MS/MS - Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por *eletrospray*
MEC - Matriz extracelular
VN - Vermelho neutro
DMEM – Meio Eagle Dulbecco modificado, do inglês, *Dulbecco's modified eagle medium*
SFB - Soro fetal bovino
DMSO - Dimetilsulfóxido
UV-Vis - Espectrofotometria no ultravioleta visível
CV - Cristal violeta
m/m – Relação massa/massa
v/v – Relação massa/volume
Kv - Quilovolt
TGA - Análise termogravimétrica
Tg -Transição vítrea
DC - Dicroísmo circular
Θ - Elipticidade em graus
FTIR-ATR - Infravermelho por transformada de Fourier com reflexão total atenuada, do inglês *Attenuated Total Reflection – Fourier Transform Infrared*
DSC - Calorimetria exploratória diferencial, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*
CME - Centro de microscopia eletrônica
MTT - *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*
HPSEC - Cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance, do inglês *High Performance Size Exclusion Chromatography*
RMN - Ressonância magnética nuclear
RI - Índice de Refração, do inglês, *Refractive index*
MALS - Detector de espalhamento de luz laser com multiângulos, do inglês *Multi Angle Light Scattering*
TMSP - Ácido trimetilsilil propiônico
M - Ácido manurônico
G - Ácido gulurônicos
ppm – Partes por milhão
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
PBS - Tampão fosfato
DBS - Dodecil benzoato de sódio
IC₅₀ - Concentração inibitória média
 \bar{M}_n - Massa molar numérica média
 \bar{M}_w - Massa molar ponderal média
ζ - Potencial Zeta

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
1.1 Motivação e Escopo	14
1.2 A Própolis	15
1.3 Atividades Biológicas da Própolis	18
1.3.1 Atividade Antitumoral da Própolis	18
1.3.2 Atividade Cicatrizante	20
1.4 Nanotecnologia e Biopolímeros para Encapsulação da Própolis	21
1.5 Biopolímeros para Aplicações Biomédicas	22
1.5.1 Zeína	22
1.5.2. Alginato de Sódio	26
1.6 Técnicas para Desenvolvimento de Nanodispositivos	27
1.6.1 <i>Electrospinning</i>	27
1.6.2 Gelificação Iônica – Nanogel	30
2. OBJETIVOS	33
2.1 Geral	33
2.2 Específicos	33
3. METODOLOGIA	34
3.1 Obtenção do Extrato de Própolis e Análise Química por GC-MS	34
3.2 Determinação das Atividades Biológicas da Própolis	35
3.2.1 Viabilidade Celular – Incorporação do Corante Vermelho Neutro (VN)	35
3.2.2 Proliferação Celular – Coloração com Cristal Violeta (CV)	36
3.2.3 Teste de Migração Celular (<i>Scratch-test</i>)	36
3.3 Produção das Nanofibras de Zeína e Própolis	37
3.3.2 Caracterização das Dispersões de Partida de Zeína e Própolis	38
3.3.2.1 Determinação da Viscosidade das Dispersões de Zeína 30% e Zeína 30% com Própolis em Etanol 90%	38
3.3.2.2 Dicroísmo Circular	39
3.3.2.3 Tensão Interfacial – Método da Gota Pendente	39
3.3.2.4 Potencial Zeta	39
3.3.3 Caracterização das Fibras	40
3.3.3.1 Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
3.3.3.2 Ângulo de Contato – Método da Gota Sésil	40
3.3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial	41
3.3.3.4 Quantificação da Própolis Incorporada às Fibras	41
3.3.3.5 Estudo de Biocompatibilidade das Fibras – Ensaio de MTT e Vermelho Neutro	42
3.4 Produção do Nanogel para Encapsulação da Própolis	43

3.4.1 Caracterização do Alginato de Sódio	43
3.4.1.1 Determinação da Massa Molar Ponderal Média (\bar{M}_w) por HPSEC	44
3.4.1.2 Determinação da Razão M/G por RMN	44
3.4.2 Síntese do Nanogel	45
3.4.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	45
3.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura do Nanogel.....	46
3.4.2.3 Quantificação da Própolis Encapsulada no Nanogel	46
3.4.2.4 Estudo do Perfil de Liberação da Própolis a Partir do Nanogel	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Extrato de Própolis e Análise Exploratória da sua Composição via GC-MS	49
4.2 Propriedades Biológicas da Própolis	51
4.3 Nanofibras de Zeína e Própolis	57
4.3.1 Estudo da Interação entre a Zeína e a Própolis	57
4.3.2 Fabricação e Caracterização das Nanofibras de Zeína e Própolis	62
4.3.2.1 Propriedades Espectroscópicas das Fibras por FTIR.....	66
4.3.2.2 Ângulo de Contato entre as Fibras de Zeína e Água	69
4.3.2.3 Comportamento Térmico das Nanofibras	72
4.3.2.4 Quantificação da Própolis Incorporada nas Fibras	74
4.3.2.5 Estudo de Biocompatibilidade/Citotoxicidade das Fibras.....	75
4.4 Nanogel para Encapsulação da Própolis.....	85
4.4.1 Caracterização do Alginato de Sódio	85
4.4.2 Nanogel de Alginato com Própolis	87
4.4.2.1 Propriedades Espectroscópicas do Nanogel por FTIR	90
4.4.2.2 Quantificação da Própolis Encapsulada e Estudo da Liberação a Partir do Nanogel	91
5. CONCLUSÕES	95
REFERÊNCIAS	96
Apêndice I.....	107
Anexo I – Informações acadêmicas	108
Anexo II – Produção Científica.....	110

INTRODUÇÃO

1.1 Motivação e Escopo

Os produtos naturais sempre ocuparam um lugar de extrema importância na cura de doenças. Após décadas vivendo à sombra dos produtos sintéticos, o surgimento de novas doenças infecciosas e crônicas, faz com que os produtos naturais voltem a ocupar uma posição de importância na descoberta de novos medicamentos (TRAN *et al.*, 2020; WAINWRIGHT *et al.*, 2022; ZULLKIFLEE; TAHA; USMAN, 2022). Nesse contexto está inserida a própolis, um remédio, desde que se tem registro, tão antigo quanto a civilização Egípcia.

Devido às suas muitas atividades farmacológicas relevantes e pelo fato de cada própolis ser única em sua composição química, deu-se início à investigação da fitoquímica e das atividades farmacológicas da própolis da abelha nativa brasileira sem ferrão *Melipona quadrifasciata* coletada na cidade de Blumenau – SC sob cadastro SisBio A1E6130. A sua composição química e atividades biológicas foram estudadas recentemente (HOCHHEIM, 2017). Alguns resultados promissores foram encontrados quanto à atividade antimicrobiana frente a cepas de bactérias gram-positivas e gram-negativas bem como para a atividade antimicrobiana frente às cepas de bactérias sem parede celular (Mollicutes). A amostra e suas frações também demonstraram importante atividade antiviral frente ao vírus Herpes Simplex-1 (HSV-1). Foram realizados também ensaios *in vitro* para avaliar a atividade antioxidante e testes de citotoxicidade frente a células de fibroblastos de camundongo (L929) (HOCHHEIM *et al.*, 2019, 2020; SANTOS *et al.*, 2017). Os resultados obtidos estão publicados nos artigos referidos acima e são a fundamentação para a continuidade das pesquisas relacionadas a esta amostra de própolis. Somado a isto, tem-se o lugar de destaque que o Brasil ocupa na 2ª posição na produção mundial de própolis, da qual 90% são exportadas para o Japão, devido ao seu alto índice de pureza e riqueza farmacológica (FRANÇA, 2019; VALVERDE, 2020)

Uma das grandes lacunas em relação à própolis, é a sua baixa solubilidade em meio aquoso, o que torna, muitas vezes, o seu uso limitado frente às tantas possibilidades terapêuticas (ALBERTI *et al.*, 2019). O desenvolvimento de nanodispositivos seja na forma de cápsula, emulsões, lipossomas, fibras, entre outros, vem para resolver, em grande parte, a questão da solubilidade e assim, aumentar aplicabilidade biomédica da própolis.

As questões expostas em relação à própolis propulsionam a pesquisa e desenvolvimento de novos nanodispositivos para ampliar seu uso. Para isso optou-se por trabalhar com um extrato contendo a fração apolar dessa matriz combinada com a utilização de dois biopolímeros, a zeína e o alginato, e foram empregadas duas técnicas

principais, o *electrospinning* (ou eletrofiação) e a gelificação iônica para a obtenção de nanodispositivos que pudessem ter aplicabilidade biomédica.

1.2 A Própolis

A própolis é conhecida como uma substância resinosa, heterogênea e com alta complexidade química, produzida pelas abelhas a partir dos exsudatos que elas coletam de galhos, botões, folhas ou outras partes de plantas. O material coletado é transportado pelas abelhas em suas mandíbulas até a colmeia, sendo então, transformado em própolis. Nas colmeias, a própolis serve principalmente para proteção contra microrganismos invasores, manutenção da umidade natural e para selar pequenas aberturas (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014a; POBIEGA; KRASNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019; TORETI *et al.*, 2013)

Desta maneira, cada amostra de própolis é considerada uma fonte rica e singular de moléculas bioativas, pois, devido a capacidade de voo, é muito provável que mesmo em áreas nunca exploradas pelos cientistas, as abelhas já tenham encontrado muitas moléculas com promissoras atividades biológicas (BANKOVA *et al.*, 2014; HUANG *et al.*, 2014).

A composição química da própolis varia quantitativamente e qualitativamente de uma amostra para outra e os principais fatores que contribuem para essa heterogeneidade são a região onde ela é coletada, a flora que rodeia as colmeias associada aos fatores climáticos do local de produção e a espécie de abelha envolvida (OPSENICA *et al.*, 2016; ZULHENDRI *et al.*, 2021). Isso dificulta a padronização dos extratos de própolis e por isso, cada própolis deve ser tratada de forma individual e as propriedades biológicas precisam ser determinadas igualmente.

De um modo geral, a própolis é composta por resinas (45-55%), ceras (8-35%), óleos essenciais e aromáticos (5-10%), ácidos graxos (5%), pólen (5%) e substâncias minerais (5%) (IRIGOITI *et al.*, 2021). A cada ano, diversas publicações sobre própolis são veiculadas, sendo crescente o número de moléculas químicas identificadas (BHARGAVA *et al.*, 2021; HOSSAIN *et al.*, 2022; POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2021; SALATINO, 2022; STOJKO; WOLNY; WŁODARCZYK, 2021). Dentre as classes mais comumente encontradas destacam-se os flavonoides, compostos fenólicos e os terpenos, também chamados de componentes voláteis da própolis (ANJUM *et al.*, 2018; ZULHENDRI *et al.*, 2021). A primeira revisão sobre a composição química da própolis foi publicada apenas em 2007 e baseava-se principalmente em análises feitas por cromatografia de fase líquida e fase gasosa. Hoje, com a diversificação de técnicas, incluindo ressonância magnética de carbono e hidrogênio, a quantidade de moléculas isoladas e identificadas ao redor do mundo é incontável (POPOVA; TRUSHEVA; BANKOVA, 2021; TRAN *et al.*, 2020).

É difícil generalizar uma lista dos principais componentes da própolis, porém, são comumente citados na literatura a presença de flavonoides e compostos fenólicos como pinocebrina, crisina, galangina, derivados do ácido cafeico e ácido ferúlico, apigenina, ácido gálico, quercetina, ácido cinâmico, kaempferol, ácido *p*-cumárico (Figura 1), os quais apresentam grande variação na quantidade presente entre cada amostra (BHARGAVA *et al.*, 2021; ZULHENDRI *et al.*, 2021). No Brasil, destaca-se a presença da Artepilina C como constituinte da própolis verde, produzida principalmente no Sudeste. Este derivado do ácido cinâmico possui comprovadas atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais, o que tornou tal molécula o biomarcador mais importante desse tipo de própolis (BESERRA *et al.*, 2021; ZULHENDRI *et al.*, 2021). Além dos flavonoides, muitos hidrocarbonetos sesquiterpênicos e triterpênicos, hidrocarbonetos alifáticos, esteróis e hidrocarbonetos esteroides, açúcares, aminoácidos e minerais também estão presentes na própolis (HUANG *et al.*, 2014).

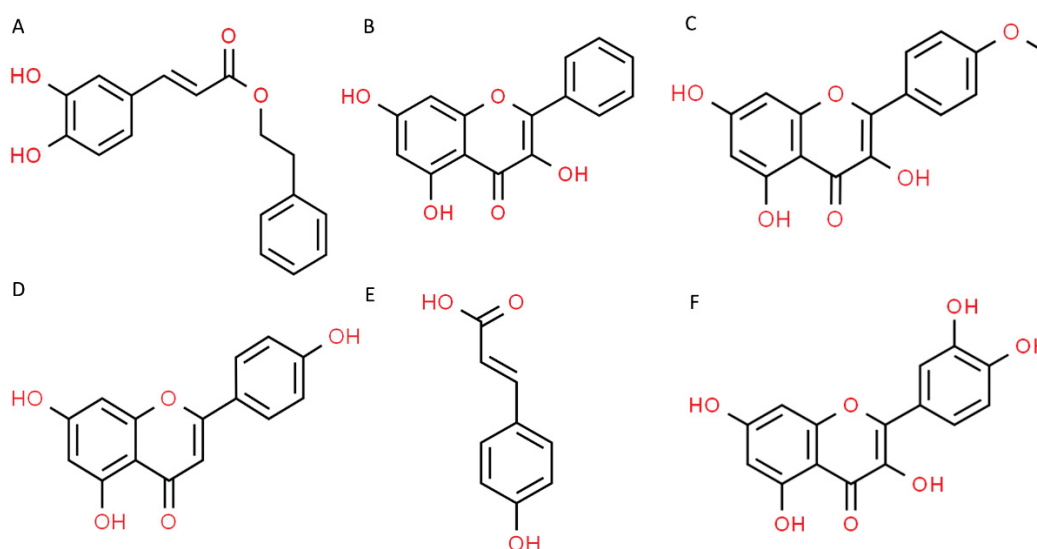


Figura 1 Estruturas químicas dos compostos fenólicos encontrados na própolis
 A. Ácido cafeico (CAPE); B. Galangina; C. Kaempferol; D. Apigenina; E. Ácido *p*-cumárico; F. Quercetina
 Fonte: Royal Society of Chemistry, [s.d.]

Durante muitos anos, os estudos sobre própolis eram focados, principalmente, na sua fração polar, devido à riqueza de potentes agentes antioxidantes, como são conhecidos a maioria dos flavonoides. Porém, nos últimos anos, há um crescente interesse, devido às suas propriedades terapêuticas, pelos componentes menos polares da própolis, onde estão contidos, majoritariamente, os terpenos (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI, 2017; BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014b; DING *et al.*, 2021; OPSENICA *et al.*, 2016). Os terpenos, formados pela união de unidades isoprênicas (Figura 2A) são os responsáveis pelo aroma e pela característica resinosa da própolis, o que faz ela ser chamada popularmente de *bee glue* ou cola de

abelhas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Comumente são identificados compostos como naftaleno, limoneno, β -cariofileno, nerolidol, eugenol, linalool (Figura 2) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021). Vários monoterpênicos, sesquiterpênicos, diterpênicos e triterpênicos foram isolados, e identificados pela primeira vez na própolis como, por exemplo, tschimgina, tschimganina, ferutinina e tefernina (TRUSHEVA *et al.*, 2010).

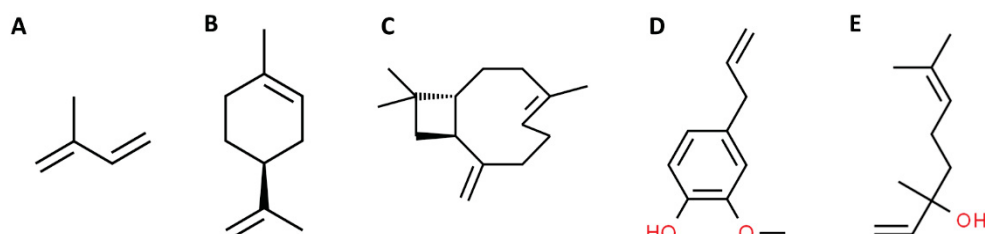


Figura 2 Terpenos encontrados na própolis
A. Unidade isoprênica; B. Limoneno; C. β -cariofileno; D. Eugenol; E. Linalool
Fonte: (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, [s.d.]

A amostra de própolis da abelha nativa brasileira sem ferrão *Melipona quadrifasciata* (SisBio A1E6130) (Figura 3) presente nesse estudo, já havia sido previamente estudada durante os anos de 2016 e 2018, na Universidade Regional de Blumenau, onde foram identificados, de forma particular, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) as moléculas torulosol, manool, 4-epi-cubebol, 10-epi-cubebol, elemol, espatulenol, β -eudesmol, mustakona, α e β -amirina, além de hidrocarbonetos de cadeia longa. E utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com ionização por *eletrospray* (HPLC-ESI-MS/MS) foi possível identificar os compostos: aromadendrina, epicatequina/catequina, pinocembrina, naringenina e ácido *p*-cumárico, além de isolar e identificar o composto sakuranetina (HOCHHEIM *et al.*, 2019, 2020; SANTOS *et al.*, 2017).

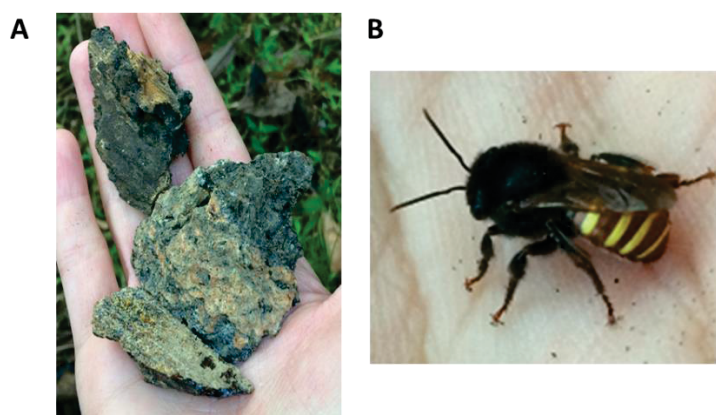


Figura 3 Imagens ilustrativas da própolis e abelha *Melipona quadrifasciata*.
A. Própolis coletada nos meliponários localizados na cidade de Blumenau – SC. B. Abelha nativa brasileira *Melipona quadrifasciata* (mandaçaia).
Fonte: A autora (2017)

1.3 Atividades Biológicas da Própolis

Devido à complexidade química da própolis já mencionada, é natural que também lhe sejam atribuídas diversas atividades terapêuticas, sendo as mais exploradas a antimicrobiana, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória (HALLAJZADEH *et al.*, 2021; POBIEGA; KRASNIEWSKA; GNIEWOSZ, 2019).

Atualmente, a própolis vem ganhando cada vez mais espaço em pesquisas relacionadas ao câncer (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI, 2017; CISILOTTO *et al.*, 2018; FALC *et al.*, 2019; GASTALDELLO *et al.*, 2021) e a atividade cicatrizante (ALBERTI *et al.*, 2019; MARTINOTTI; PELLAVIO; LAFORENZA, 2019; STOJKO; WOLNY; WŁODARCZYK, 2021). Além disso, ela já é comercialmente utilizada como suplementos alimentares para promoção da saúde, em cosméticos, cremes antiacne, cremes faciais e corporais, pomadas, loções, pastas de dente e produtos para higiene bucal. Também tem sido utilizada em alguns alimentos e bebidas como na substituição do agente conservante ou suplemento alimentar (ANJUM *et al.*, 2018; BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014b; TRAN *et al.*, 2020).

Outro ponto a ser destacado sobre a própolis é o crescente interesse na atividade imunomoduladora e antiviral que ela exerce. Em meio ao cenário pandêmico dos últimos anos, o uso da própolis como protetor da imunidade ganhou destaque devido à sua capacidade de inibir a liberação de citocinas inflamatórias e assim, diminuir os efeitos da doença causada pelo novo coronavírus (Sars-CoV-2). Alguns estudos estão sendo realizados como forma de comprovar o mecanismo envolvido na atividade antiviral da própolis frente ao Sars-CoV-2 (ALI; KUNUGI, 2021; FIORINI *et al.*, 2021; RIPARI *et al.*, 2021). Outra abordagem ainda, discute a inserção da própolis em vacinas, como uma forma de aumentar a resposta de produção de anticorpos no momento da vacinação (EL ASHRY; AHMAD, 2012; RIPARI *et al.*, 2021).

1.3.1 Atividade Antitumoral da Própolis

O câncer é um distúrbio hiperproliferativo que induz transformação morfológica, perturba a sinalização apoptótica e impulsiona a proliferação descontrolada, invasão, angiogênese e propagação de metástases (ORŠOLIĆ; JAZVINŠČAK JEMBREK, 2022). Algumas células cancerígenas podem ser resistentes à quimioterapia o que acaba por diminuir a eficácia de certos medicamentos (ZULLKIFLEE; TAHA; USMAN, 2022), por isso, muitas pesquisas clamam pela urgência em se encontrar novas moléculas para o tratamento de cânceres. Isso nos leva aos produtos derivados de abelhas, como a própolis e o mel que são capazes de atuar em múltiplas vias e podem ser considerados como

candidatos promissores na prevenção e tratamento do câncer (ORŠOLIĆ; JAZVINŠČAK JEMBREK, 2022; TRAN *et al.*, 2020).

Os mecanismos envolvidos na atividade antitumoral da própolis são principalmente ligados à sua capacidade antioxidante, anti-inflamatória e a sua capacidade de elevar a imunidade humoral (ORŠOLIĆ; JAZVINŠČAK JEMBREK, 2022). Mais especificamente a própolis é capaz de aumentar as espécies reativas de oxigênio, agindo como um pró-oxidante dentro das células tumorais, o que pode causar danos ao DNA celular e induzir a morte celular por apoptose, ligar-se aos receptores hormonais, regular e modular o crescimento celular, dentre outros (BHARGAVA *et al.*, 2021; ELUMALAI *et al.*, 2022).

O câncer de pele é um dos tipos mais comuns de câncer, podendo ser maligno ou não maligno, ambos causados pela exposição crônica excessiva ao sol. A radiação ultravioleta é capaz de induzir mutações nos melanócitos e assim, causar o melanoma (KALAORA *et al.*, 2022). Já existem alguns trabalhos publicados que comprovam que a própolis e seus compostos ativos apresentam atividades antiproliferativas, citotóxicas, antiangiogênicas e imunomoduladoras para várias linhagens de células de melanoma (CHIU *et al.*, 2020).

Cisilotto *et al.* (2018) estudaram a própolis da abelha mandaçaia frente à linhagem de melanoma B16-F10 e provaram a capacidade da própolis em diminuir a expressão de proteínas importantes que regulam a apoptose celular e na capacidade de inibir a migração e invasão celular (mecanismos estes, envolvidos na progressão e metástase tumoral).

Num estudo realizado por Pratsinis *et al.*, (2010) com uma amostra de própolis da Grécia, foram isolados diversos terpenos, dentre eles o manool. Esses compostos foram estudados quanto aos seus efeitos citotóxicos em linhagens tumorais. Dentre todos os compostos isolados, o manool foi o que necessitou de uma menor concentração para exercer efeito citostático em linhagens tumorais de adenocarcinoma de cólon e fibrosarcoma.

Gastaldello *et al.* (2021) investigaram o comportamento tumoral do melanoma tratado com os compostos bacarina e ácido *p*-cumárico, extraído da própolis verde, em camundongos inoculados com células B16-F10. Os autores observaram uma modulação significativa no número de células inflamatórias recrutadas para a região tumoral e uma redução significativa na quantidade de vasos sanguíneos e mitose na área neoplásica.

Além disso, a própolis já demonstrou ser ativa contra diversos outros tipos tumorais como leucemia (FRANCHI *et al.*, 2012), pâncreas (AWALE *et al.*, 2008), próstata, pulmão, mama (TAZAWA *et al.*, 2015), dentre outros. Porém, como sua composição química varia amplamente é necessário ter cuidado ao se fazer generalizações. A maioria dos estudos envolve também extrato hidroalcoólico com maior concentração de flavonoides, enquanto

os estudos com terpenos provenientes da própolis são mais escassos (AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI, 2017).

1.3.2 Atividade Cicatrizante

Feridas de difícil cicatrização são consideradas um problema de saúde pública, pois muitas vezes são causadas por doenças crônicas como diabetes, úlceras de pressão ou úlceras venosas que impactam significativamente na qualidade de vida das pessoas, ou ainda, aumentam a mortalidade e o tempo de internação dos pacientes, elevando gastos com internações e curativos (CONCEIÇÃO *et al.*, 2022; DA ROSA *et al.*, 2022).

A cicatrização de feridas na pele é um processo complexo no qual uma série de células e mediadores moleculares são mobilizados para remover patógenos do local, e criar um ambiente que favoreça a deposição de matriz extracelular e fatores de crescimento e por fim proliferação celular e fechamento da ferida (CONCEIÇÃO *et al.*, 2022)

Nesse sentido, devido principalmente aos seus compostos fenólicos, a própolis pode agir em diversas frentes, e assim, auxiliar no encurtamento do tempo de cura de feridas. Ao combater os radicais livres, atuar contra as bactérias infectantes, diminuir a migração de células inflamatórias e inibir a secreção de citocinas inflamatórias, a própolis contribui para síntese e deposição organizada do colágeno. Ao estimular a reconstrução da matriz de colágeno no local danificado, o uso da própolis promove a reepitelização e cria um ambiente bioquímico favorável à cicatrização de feridas, além de minimizar a formação de quelóide e excesso de cicatriz (ALBERTI *et al.*, 2019; STOJKO; WOLNY; WŁODARCZYK, 2021; YANG *et al.*, 2022)

Martinotti & *et al.* (2019) utilizando um ensaio de migração celular (*Scratch*), junto com outras técnicas e biologia molecular, comprovaram que a própolis é capaz de facilitar o transporte de água através dos canais conhecidos como aquaporinas, tais aquaporinas possuem um papel fundamental na migração celular, mantendo a hidratação e elasticidade da pele, e auxiliando assim, no fechamento de feridas. Alguns ensaios *in vivo* utilizando ratos e cachorros também já foram feitos. O acompanhamento do fechamento das feridas é feito aplicando-se a própolis durante 14 a 21 dias e então ao comparar com os grupos controle, assim, puderam perceber uma melhor cicatrização ao utilizar-se pomadas à base de própolis. Os autores atribuíram esse efeito principalmente à capacidade da própolis em diminuir a liberação de citocinas inflamatórias no local da ferida (ABU-SEIDA, 2015; CONCEIÇÃO *et al.*, 2022; HAN *et al.*, 2005).

A própolis também já vem sendo utilizada em muitos ensaios clínicos como evidenciado por uma extensa revisão bibliográfica feita por Da Rosa *et al.*, (2022). Os autores enfatizam que há a necessidade de padronizar o tipo de administração e a

concentração de própolis para cada tipo de ferida, e que novos estudos são importantes para aumentar o uso da própolis como um importante agente cicatrizante.

1.4 Nanotecnologia e Biopolímeros para Encapsulação da Própolis

Um dos grandes problemas em relação à própolis, é a sua baixa solubilidade em água. A nanotecnologia é uma ferramenta adequada para resolver muitos problemas relacionados à utilização de ativos de baixa solubilidade em meio aquoso. A proteção conferida aos componentes bioativos durante a estocagem do produto, bem como a estabilidade no ambiente ácido do trato gastrointestinal após a deglutição, e o delineamento para que atinjam determinados sítios de ação e tornem-se mais biodisponíveis, são algumas das vantagens relacionada à nanoencapsulação de ativos de baixa solubilidade. Outra vantagem, é o mascaramento de sabor e odor desagradáveis, encontrados em produtos naturais de maneira geral. Dessa forma, amplia-se a possibilidade de utilização desses compostos em alimentos e nutracêuticos (BUSCH *et al.*, 2017; GAROFULIC *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2018; RAMLI *et al.*, 2021; SOLEIMANIFARD; FEIZY; MAESTRELLI, 2021).

A encapsulação da própolis em tamanhos nanométricos pode aumentar a eficácia sem alterar suas propriedades, e essa abordagem pode ser feita por diferentes métodos (SUNDARAMURTHY; SUNDRAMOORTHY, 2018; TATLI SEVEN *et al.*, 2018). Para isso, biopolímeros vem sendo amplamente utilizados, uma vez que possuem cadeias que podem ser manipuladas de diferentes formas visando a liberação modificada ou a atuação em alvos específicos. Além disso, biopolímeros possuem a vantagem de serem biodegradáveis, biocompatíveis e, geralmente, de baixo custo.

Soleimanifard *et al.* (2021) encapsularam a própolis com diferentes proporções de caseína e maltodextrina, e conseguiram atingir 96% de eficiência de encapsulação com maiores proporções da fração proteica formadora da parede da cápsula, comprovando assim, seu potencial uso para produtos farmacêuticos. Tong Kong & Veloo Kutty (2021) sintetizaram micelas feitas de um derivado hidrossolúvel da vitamina E (TGPS) e demonstraram através do rastreamento de uma molécula alvo constituinte da própolis - o derivado do ácido cafeico (CAPE) - que foi possível encapsular 90% do material e assim, garantir a sua estabilidade. Com o objetivo de proteger os flavonoides presentes na própolis contra a oxidação, RAMLI *et al.*, (2021) desenvolveram lipossomas feitos com fosfatidilcolina e colesterol, nos quais há uma interação ótima entre os componentes apolares da própolis e as membranas lipossomais, demonstrando assim, potencial para sistemas de liberação de própolis em alimentos funcionais e produtos para a saúde.

Outros nanodispositivos de características inovadoras contendo própolis também vem sendo formulados. Aranci *et al.*, (2020) formularam protótipos de curativos feitos em impressora 3D com mistura de alginato e própolis, e comprovaram que o curativo possui atividade antimicrobiana contra bactérias infecciosas, auxiliando assim, numa recuperação tecidual mais saudável. Yong & Liu (2021) realizaram uma extensa revisão bibliográfica sobre filmes de revestimento aditivados com própolis, a grande maioria dos filmes demonstrou aplicação para conservação de alimentos e atividade antimicrobiana. Nesse sentido, também as nanofibras feitas pela técnica de *electrospinning* são importantes matrizes para a incorporação da própolis, que pode ser utilizadas tanto para curativos e cicatrização como para o recobrimento e proteção de alimentos (MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2018; RAZAVIZADEH; NIAZMAND, 2020).

Muitos outros nanodispositivos para a proteção e liberação controlada da própolis estão em desenvolvimento (TATLI SEVEN *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2021), e as técnicas aplicadas variam das mais simples, até mais complexas. Devido às diferenças encontradas em cada técnica de incorporação em nanoestruturas, deve-se refletir sobre qual a maneira mais apropriada para cada tipo de própolis, levando em consideração a sua composição química, a característica das moléculas com a atividade desejada e a aplicação a que se destina o dispositivo formado (ALBERTI *et al.*, 2019).

1.5 Biopolímeros para Aplicações Biomédicas

A utilização de biopolímeros para a fabricação de dispositivos biomédicos, é interessante devido à sua compatibilidade com sistemas fisiológicos, tornando-se sistemas seguros pois, após metabolização pelo corpo, os subprodutos de sua degradação podem ser eliminados por vias naturais como a filtração (TONG KONG; VELOO KUTTY, 2021). Além disso, muitos biopolímeros são extraídos de resíduos industriais, o que torna a cadeia produtiva mais sustentável.

1.5.1 Zeína

A zeína é a principal proteína presente no milho, pertence à classe das prolaminas e é composta por muitos resíduos de aminoácidos lipofílicos (PASCOLI; DE LIMA; FRACETO, 2018). Esse biopolímero proteico vem sendo estudado devido ao seu potencial em servir como material estrutural para filmes de revestimento, tanto de alimentos, como de medicamentos. Devido à presença dos resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, uma barreira protetora eficaz é alcançada pela zeína, pois impede a entrada de ar e umidade em seu filme. Porém, essa mesma proteção, é rapidamente desfeita em ambientes com

alta atividade de água, o que torna a zeína um biopolímero interessante para sistemas de entregas de medicamentos (BARBEDO *et al.*, 2017; BECK; TOMKA; WAYSEK, 1996).

Quimicamente a zeína é composta por diferentes unidades polipeptídicas que podem ser divididas em quatro principais classes (α -, β -, γ -, δ -zeína). A zeína comercial é formada basicamente por α -zeína, que corresponde a cerca de 70% do total das frações, há um predomínio dos aminoácidos Leucina > Alanina > Glicina > Prolina (Figura 4).

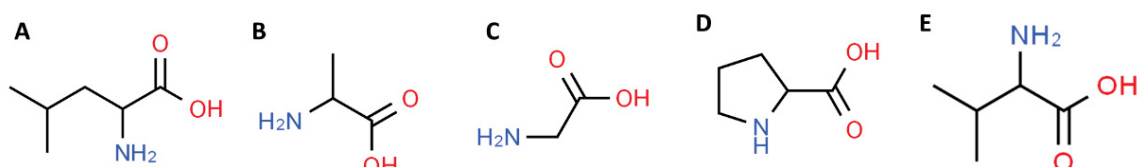


Figura 4 Aminoácidos apolares de maior abundância presentes na fração zeína
A. Leucina; B. Alanina; C. Glicina; D. Prolina; E. Valina
Fonte: ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, [s.d.]

Para a fração β , há um predomínio de Glicina > Alanina > Tirosina > Leucina. Para a fração γ -zeína há um predomínio de Prolina > Glicina > Leucina > Histidina. Para a fração δ -zeína há um predomínio de Metionina > Prolina > Glicina > Leucina (DA SILVA *et al.*, 2020). Na fração α -zeína, mais de 50% de seus aminoácidos possuem caráter apolar e as interações hidrofóbicas são importantes para os processos de auto-organização, tornando a zeína muito interessante para a manipulação de nanopartículas e nanofibras (YU *et al.*, 2020). Na Figura 5 estão representados os modelos adaptados por ZHANG *et al.* (2021) que foram propostos por Zhang *et al.* (2016) (Figura 5A) e Coleman *et al.* (1999) (Figura 5B) para a disposição espacial da fração α -zeína, bem como um modelo computacional (Figura 5C) proposto por Momany *et al.* (2006) em que a exposição dos aminoácidos leucina, valina e alanina forma uma face hidrofóbica na zeína.

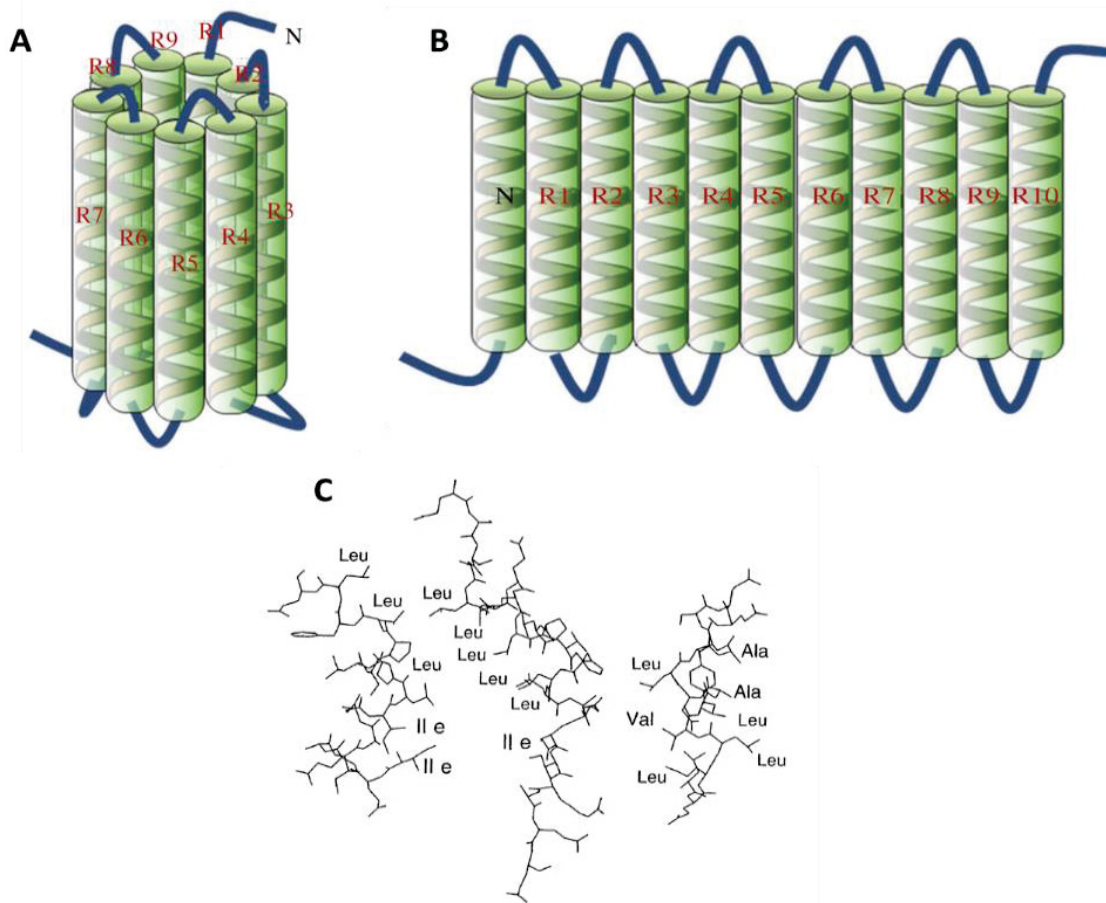


Figura 5 Estrutura química da fração α -zeína
 A. Modelo proposto por Zhang *et al.* (2016) B. Coleman *et al.* (1999) e C. Momany *et al.* (2006).
 Fonte: adaptado de MOMANY *et al.* (2006) e ZHANG *et al.* (2021)

Uma das técnicas para caracterizar proteínas, como a zeína, é o dicroísmo circular (DC), uma técnica espectroscópica utilizada para avaliar a estrutura secundária, propriedades de dobramento e ligação de proteínas em meio a um sistema líquido e interesse (ARTEAGA; EL-HACHEMI; OSSIKOVSKI, 2019; GREENFIELD, 2009). Nessa técnica, quando os cromóforos das amidas das proteínas estão alinhados em matrizes, suas transições ópticas são deslocadas ou divididas em transições múltiplas devido às interações com a luz, ou seja, ocorre a absorção desigual de luz polarizada no sentido horário e anti-horário e essa diferença é expressa em termos de elipticidade em graus (θ) (KELLY; JESS; PRICE, 2005). O resultado é que diferentes estruturas proteicas têm espectros de DC característicos. Por exemplo, proteínas α -helicoidais têm bandas negativas em 222 nm e 208 nm e uma banda positiva em 193 nm. Proteínas com estruturas antiparalelas bem definidas, folhas β têm bandas negativas em 218 nm e bandas positivas em 195 nm, enquanto as proteínas desordenadas têm elipticidade muito baixa acima de 210 nm e bandas negativas perto de 195 nm (Figura 6) (BICUDO *et al.*, 2007; CABRA *et al.*, 2008; GREENFIELD, 2009).

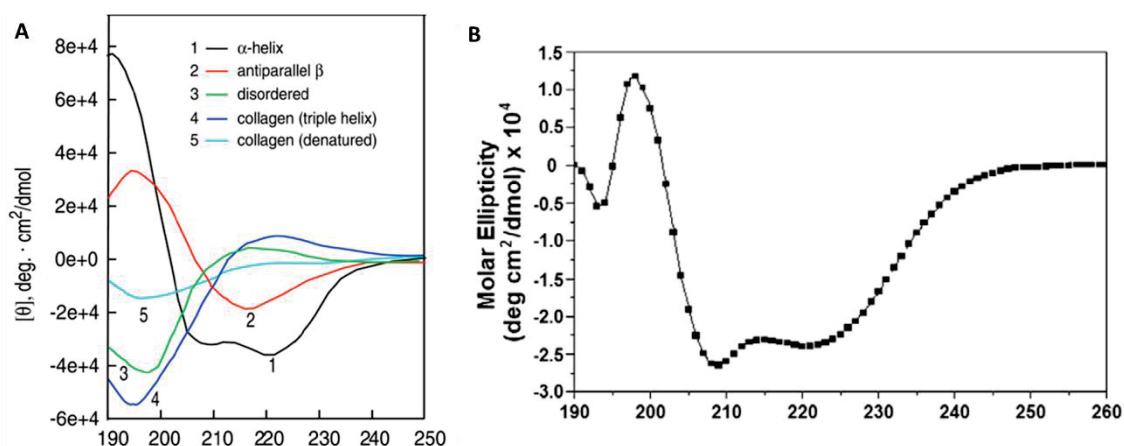


Figura 6 Espectro de dicroísmo circular A. diferentes estruturas proteicas secundárias e B. zeína a 2 mg mL⁻¹ solubilizada em etanol 90%.

Fonte: Greenfield, (2009) e Cabra *et al.* (2008).

As propriedades da zeína permitem produzir membranas e filmes que podem substituir os plásticos para vários propósitos como proteção para alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, agentes de revestimento e adesivos (JASKI *et al.*, 2022). Porém, um dos problemas em relação aos filmes de zeína é a sua fragilidade devido à baixa mobilidade de suas cadeias poliméricas o que lhe confere baixa capacidade de alongamento e propriedades térmicas desfavoráveis. Para melhorar as propriedades reológicas de filmes feitos com zeína, agentes plastificantes, como ácidos graxos e glicerol, são comumente adicionados à sua formulação diminuindo assim a quebra do material e aumentando a sua capacidade de deformação (BARBEDO *et al.*, 2017; HUO *et al.*, 2018).

Um fator importante em relação à zeína é a capacidade de incorporar componentes de interesse terapêutico em sua matriz. Esses componentes devem ser, principalmente, de caráter hidrofóbico, o que facilitaria a introdução, em matrizes poliméricas, de óleos essenciais (NOBILE *et al.*, 2008), de extratos vegetais e também de própolis, todos conhecidos pelas suas propriedades terapêuticas.

O uso de zeína em fibras eletrofiadas pode dar origem a interessantes sistemas para a engenharia de tecidos, em que as fibras podem servir como um sistema de liberação de fármacos e proteínas que auxiliam na cura tecidual (JASKI *et al.*, 2022). Apesar de muitos estudos corroborarem para as atividades terapêuticas da própolis, sua incorporação em filmes ou outros materiais feitos de zeína ainda é pouco relatada. Com isso, é válido estudar novas performances para dispositivos feitos de zeína, principalmente por tratar-se de um subproduto biodegradável da indústria de milho, o que corrobora com os princípios da química verde.

1.5.2. Alginato de Sódio

O alginato é um polissacarídeo iônico de ocorrência natural em algas marrons, que devido à natureza salina do meio ambiente em que se encontra traz características interessantes para a sua aplicação no desenvolvimento de materiais. Os polissacarídeos iônicos apresentam propriedades físico-químicas específicas devido ao seu caráter polieletrólito e às suas características resultantes da sua estéreo-regularidade (BRACCINI; GRASSO; PÉREZ, 1999)

A estrutura do alginato foi descrita pela primeira vez com maior detalhamento em 1966 por Haug & Col. Quimicamente (Figura 7), o alginato é um polissacarídeo aniônico, formado por unidades de ácido α -L-gulurônico (G) e ácido β -D-manurônico (M) unidas por ligação 1,4-glicosídicas que se organizam em diferentes arranjos (MM, GG e MG) e proporções dependendo de sua fonte (HAUG; LARSEN; SMIDSRØD, 1974; SIMAS-TOSIN *et al.*, 2017).

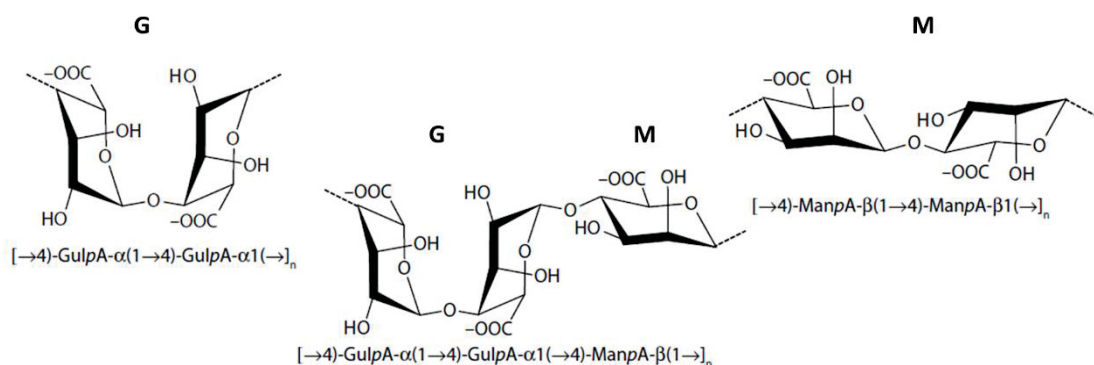


Figura 7: Estrutura molecular do Alginato: G = ácido α -L-gulurônico (GulpA), M = ácido β -D-manurônico (ManpA), unidas por ligação 1,4-glicosídicas.
Fonte:SIMAS-TOSIN *et al.* (2017).

Devido ao pKa dos grupos G e M ser aproximadamente 3,5, os grupos funcionais carboxilas (COOH) estão em parte negativamente carregados em pH em torno de 5 (PISTONE *et al.*, 2013) possibilitando a formação de ligações cruzadas com cátions e originando uma estrutura conhecida como *egg-box* (BRACCINI; PÉREZ, 2001) (Figura 8). Os blocos G do alginato, devido à sua organização espacial mais “fechada” acomodam melhor os íons divalentes do que as unidades M, dessa forma, materiais com diferentes propriedades físico-químicas podem ser gerados (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; ENGBERT; PLANK, 2020). A presença dos blocos GG são então, vitais, para a formação de géis de alginato, pois elas formam uma interação estável com cátions divalentes, que possibilitam a formação de géis fortes, rígidos e porosos (ENGBERT; PLANK, 2020; SIMAS-TOSIN *et al.*, 2017).

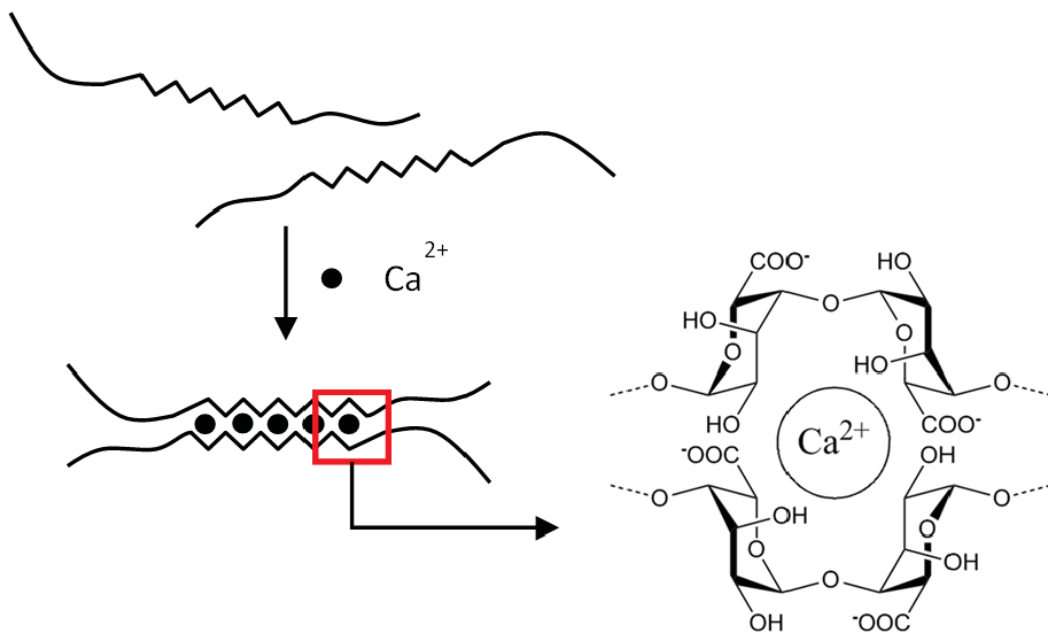


Figura 8: Estrutura *egg-box* do alginato: formação de ligações coordenadas entre o Ca^{2+} e os grupos carboxilatos do alginato.
 Fonte: Paques, *et al.* (2014)

O alginato já é consagrado na utilização em engenharia de tecidos em substituição às cartilagens, reconstituição de ossos, córnea, vasos sanguíneos; na cicatrização de feridas na forma de hidrogéis e curativos, dentre tantas outras aplicações (FAROKHI; SHARIATZADEH; SOLOUK, 2019; LEE; MOONEY, 2001). Além disso, já é amplamente utilizado em sistemas de liberação de medicamentos, contudo, as nanocápsulas formadas por polímeros de alginato são conhecidas pela sua baixa estabilidade e perda do material encapsulado, e por isso algumas estratégias para estabilizá-las podem ser utilizadas: polímeros catiônicos como a quitosana têm sido usados associados ao alginato para superar as limitações da perda rápida do material (ROY *et al.*, 2013); Outra estratégia, é induzir a formação de hidrogéis ou microesferas de alginato pela técnica de gelificação iônica, na qual cátions multivalentes, como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} são gotejados sobre a dispersão polimérica (SUNDARAMURTHY; SUNDRAMOORTHY, 2018).

1.6 Técnicas para Desenvolvimento de Nanodispositivos

1.6.1 *Electrospinning*

O *electrospinning* (Figura 9) é uma técnica efetiva que para a produção de fibras com diâmetro de dezenas de nanômetros a micrometros. Para isso, são utilizados dispositivos capazes de gerar altas diferenças de potencial entre uma seringa contendo uma dispersão de polímero a ser eletrofiado e um alvo. Uma vez que uma tensão é aplicada, ocorre um fenômeno eletrodinâmico em que o polímero em dispersão adquire

uma carga que sobrepõe a tensão superficial do líquido, este por sua vez, adquire energia cinética e é forçado em um jato que sai da ponta da seringa e é atraído até a superfície em que se deseja depositar a fibra. Nesse trajeto o solvente é evaporado, permitindo que as fibras geradas sejam depositadas (COLLINS; FEDERICI; CATALANI, 2012; ZAHEDI *et al.*, 2010).

Para a fabricação das fibras deve-se levar em consideração que muitos fatores podem influenciar a qualidade das fibras formadas, dentre os principais estão a voltagem aplicada, a viscoelasticidade das soluções de polímeros, a densidade de cargas e a tensão superficial das soluções (LIU *et al.*, 2008). As condições experimentais tais como fluxo da seringa, distância entre a seringa e o coletor, umidade relativa do ambiente, taxa de evaporação do solvente também exercem influência sobre a formação das fibras, sendo parâmetros importantes a serem estabelecidos.

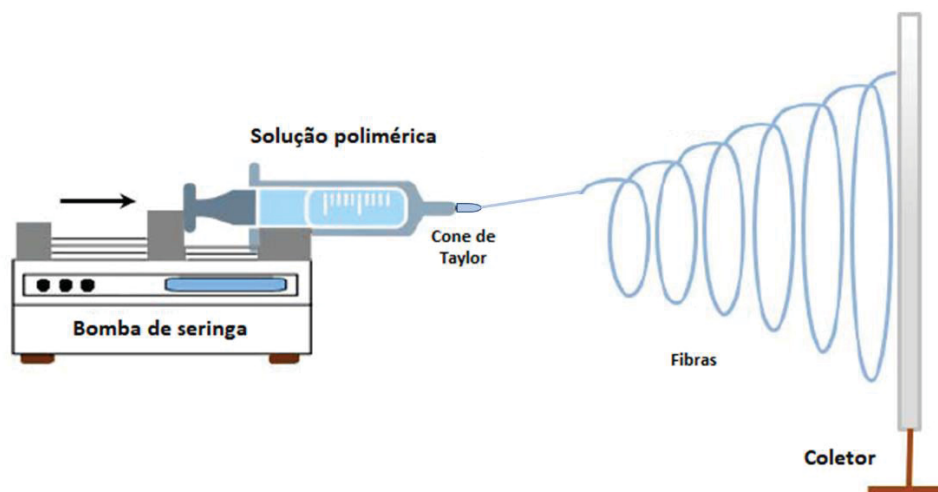


Figura 9 Representação esquemática da técnica de *electrospinning*.
Fonte: A autora

Para o desenvolvimento de nanofibras por *electrospinning*, as propriedades das dispersões poliméricas tanto do *bulk* como da interface devem ser consideradas juntas, uma vez que a reologia do *bulk* é importante na região do cone de Taylor e inicialização do jato. No entanto, a formação de fibras é basicamente um fenômeno de interface, e portanto, a reologia interfacial é crucial para a estabilização e continuidade do jato, e conseqüentemente, para a qualidade das fibras, pois é na interface que os polímeros se reorganizam (ROŠIĆ *et al.*, 2012).

A viscosidade das dispersões é um dos parâmetros mais importantes a ser considerado nessa técnica. É necessário que ocorra um entrelaçamento das cadeias poliméricas, e, portanto, é necessário trabalhar-se acima da concentração crítica (C^*) dos polímeros, do contrário, apenas um *electrospray* é obtido (COELHO *et al.*, 2022). Quanto

mais viscosas as dispersões, mais conectadas estarão as cadeias e assim previne-se a desestabilização de Plateau-Rayleigh (Figura 10A) resultando em fios mais alongados e fibras uniformes (AKINALAN BALIK; ARGIN, 2020; COLLINS; FEDERICI; CATALANI, 2012).

Todos os parâmetros citados acima estão diretamente relacionados com a formação de *beads*. As *beads* (Figura 10B) são pequenos acúmulos de material, que formam ao longo da fibra, o chamado “colar de contas”, que reflete uma baixa homogeneidade do material gerando fibras de baixa qualidade, e são, portanto, indesejados (AKINALAN BALIK; ARGIN, 2020; KEIROUZ *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2008).

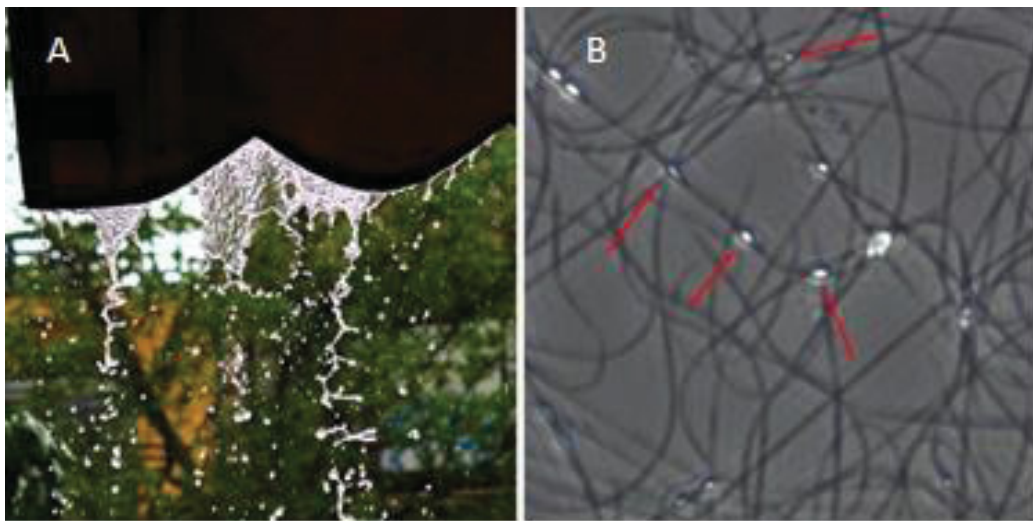


Figura 10 A. O fenômeno natural da Instabilidade de Plateau-Rayleigh: A que a água é exposta ao escorrer de um toldo e B. o seu efeito na formação de *beads* (setas vermelhas)
FONTE: A autora

O desenvolvimento de nanofibras tem demonstrado ser muito promissor para mimetizar a arquitetura natural de tecidos humanos em escala nanométrica, e assim, vem sendo muito empregado na engenharia de tecidos e no desenvolvimento de modelos de cultivo celular 3D (DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 2011; YE *et al.*, 2019). As fibras geradas com biopolímeros apresentam uma grande área superficial específica, alta porosidade, estruturas biomiméticas da matriz extracelular (MEC) e melhor biocompatibilidade. Além disso, a MEC pode ligar, liberar e ativar moléculas de sinalização e pode modular a reação da célula a fatores solúveis. Assim, as fibras podem ser funcionalizadas com muitas substâncias bioativas, como proteínas, peptídeos e fármacos de moléculas pequenas (YE *et al.*, 2019), podendo promover a adesão, proliferação e diferenciação celular e servindo como suporte para liberação prolongada desses ativos além de fornecer informações mais detalhadas sobre o comportamento celular *in vitro* (BONINO *et al.*, 2011; BRAHATHEESWARAN *et al.*, 2012; YE *et al.*, 2019; ZAHEDI *et al.*, 2010).

Muitos polímeros, sintéticos e/ou naturais, e até mesmo materiais inorgânicos, podem ser utilizados para a fabricação das fibras. Contudo, a grande maioria das fibras fabricadas utilizam solventes tóxicos para a dissolução dos polímeros ou para a sua reticulação, fazendo-se necessário uma etapa de lavagem para essas fibras a fim de melhorar a sua biocompatibilidade (ASGARI; BAGHERI; ES-HAGHI, 2018; BONINO *et al.*, 2011; ZAHEDI *et al.*, 2010). Nesse sentido, o uso de polímeros que possam ser eletrofiados sem o uso desses solventes é ainda um campo a ser explorado para aplicações biomédicas.

Embora as publicações que relatam nanofibras contendo própolis sejam bastante limitadas, alguns tipos de nanofibras sintéticas já foram produzidos. Recentemente, Razavizadeh & Niazmand (2020) sintetizaram fibras de poliamida-6 com própolis e provaram que as fibras obtidas apresentam boa capacidade antioxidante, fornecendo compostos fenólicos da própolis. Como a própolis já é amplamente utilizada em produtos de higiene oral, Asawahame *et al.* (2015), produziram fibras de rápida dissolução oral com polivinil pirrolidona (PVP) contendo 2% de própolis que pode ser potencialmente utilizada para tratamentos infecciosos orais. Bilginer *et al.*, (2021) utilizaram uma mistura de poli(álcoolvinílico) (PVA) e própolis para montar um biocomposto utilizado em cultura celular 3D, facilitando assim a ancoragem e a proliferação celular.

Algumas nanofibras baseadas em misturas de polímeros sintéticos e biopolímeros contendo própolis também estão sendo produzidas. Ulag *et al.* (2021) adicionaram 0,5% de gelatina a uma dispersão de 13% de PVA que demonstrou adquirir as condições ideais para a produção de fibras contendo 3% a 5% de própolis para combater infecções oculares. Ionescu *et al.* (2021), produziram fibras de quitosana com poli(óxido de etileno), melhorando a condição de *electrospinning* e incorporando extratos de calêndula e própolis nas fibras, que demonstraram ser biocompatíveis, e possuir atividades antioxidantes e antibacterianas, melhorando assim o processo de cicatrização de feridas. O primeiro trabalho sobre produção de fibras utilizando apenas zeína e própolis, sem o uso de outros polímeros e sal, foi publicado por Moradkhannejhad *et al.*, (2018). Os autores provaram que é possível produzir fibras uniformes sem grânulos e com boa reprodutibilidade. A própolis conferiu atividade antimicrobiana às fibras, mas a biocompatibilidade e outras aplicações biomédicas não foram investigadas.

1.6.2 Gelificação Iônica – Nanogel

O método de gelificação ionotrópica foi descrito pela primeira vez em 1997 por Calvo *et al.*, para a fabricação de nanopartículas de quitosana na presença de tripolifosfato de sódio (TTP) para a encapsulação de proteínas. A quitosana, por ser um polímero

catiônico, interage com os grupos de fosfato carregados negativamente podendo servir para a encapsulação de ativos (JING JIE CHIA *et al.*, 2022).

Após modificações feitas por diversos autores, a gelificação iônica tornou-se o método mais comumente utilizado para formar as partículas de alginato reticuladas classicamente com o íon Ca^{2+} (XUE *et al.*, 2015). Porém, além do alginato reticulado com cálcio, outros polissacarídeos com carga negativa, como pectina formam géis ionotrópicos na presença de outros cátions divalentes como o Zn^{2+} e o Fe^{2+} , que atuam como agentes reticulantes entre cadeias de polissacarídeos (MAIRE DU POSET *et al.*, 2019).

As ligações cruzadas com os cátions podem ser feitas utilizando os métodos de gelificação interna e gelificação externa. Na produção de micropartículas por gelificação externa (ou método de difusão), a dispersão de alginato é gotejada em uma solução de cloreto de cálcio (ou vice-versa). Os cátions difundem da fase contínua para o interior das gotículas de alginato, formando uma matriz gelificada mais compacta em suas bordas e mais difusa em seu interior. Para a gelificação interna, um sal de cálcio insolúvel (CaCO_3) é adicionado à dispersão de alginato. Reduzindo o pH e/ou aumentando a solubilidade do cálcio do sistema, os íons de cálcio são liberados do interior da fase de alginato formando um gel de alginato mais homogêneo, menos denso e com poros maiores, resultando em menor taxa de encapsulação e liberação mais rápida de conteúdo (CHAN; LEE; HENG, 2006; PAQUES *et al.*, 2014).

Durante a gelificação iônica externa o cátion difundido, por gotejamento, para o interior das cadeias poliméricas, permite que ligações sejam formadas entre os grupos funcionais negativamente carregados e os íons positivos adicionados. Essas ligações dão origem as partículas, que podem ser de diferentes tamanhos dependendo, principalmente, da concentração dos polímeros utilizadas na síntese, do fluxo de íons gotejados e da velocidade de agitação aplicada ao frasco reacional (SALVATI; SANTAGAPITA; PERULLINI, 2022).

Grande parte das partículas de alginato descritas na literatura possuem um diâmetro maior do que 100 μm . Contudo, partículas menores do que 1 μm têm muitas vantagens, como por exemplo, maior resistência mecânica e maior área superficial, o que é especialmente importante em sistemas de liberação de fármacos (ALGHARIB *et al.*, 2022; PAQUES *et al.*, 2014). Durante o processo de gelificação, as ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas sobrepostas formam géis macroscópicos, enquanto as nanopartículas são formadas quando baixas concentrações de polímeros são utilizadas (PISTONE *et al.*, 2013) originando os chamados nanogéis. Esses nanogéis podem então, encapsular materiais de interesse podendo ser utilizados para diversas aplicações terapêuticas, alimentícias, industriais, dentre outras.

Os nanogéis reticulados têm capacidade de manter a sua estrutura e resistir ao inchamento dependendo do pH e dos íons que se encontram no ambiente. Essa propriedade dá a possibilidade de manipular a capacidade do gel em liberar o seu conteúdo no ambiente desejado. Ao induzir uma troca iônica entre as cadeias poliméricas e o meio, pode haver o inchamento do nanogel, afrouxamento das cadeias e por fim, a liberação do conteúdo no ambiente desejado (DA SILVA *et al.*, 2022; REDDY; REDDY; JIANG, 2015).

O zinco é um cátion divalente que participa como cofator de mais de 300 enzimas corporais. Este micronutriente está presente predominantemente na pele, onde desempenha papel importante no metabolismo de lipídios, proteínas e genes. O zinco é ainda antioxidante, regulador da inflamação e antibacteriano, podendo ser útil no tratamento de diversas patologias infecciosas e inflamatórias da pele, como por exemplo a acne, infecções fúngicas e rosácea. Além disso, o zinco tem um papel fundamental na cicatrização, pois as metaloproteinases – enzimas reguladoras da reparação tecidual – são dependentes de zinco (GUPTA *et al.*, 2014; SCHWARTZ; MARSH; DRAELOS, 2005). Por estes motivos, o zinco foi tratado, neste trabalho, como um agente reticulante de interesse para o nanogéis de alginato, que visam, dentre outros objetivos, potencializar a ação cicatrizante da própolis.

Os nanogéis são plataformas de *drug-delivery* inovadoras e que vem ganhando, a cada dia, mais aplicações em sistemas transdermais (MAVUSO *et al.*, 2015; SULTANA *et al.*, 2013). Abnoos *et al.* (2018) sintetizaram nanogéis recobertos com quitosana para aplicação tópica de liberação prolongada do fármaco pirfenidona. Assim como El-Feky *et al.* (2017) conseguiu, com sucesso, encapsular a sulfadiazina de prata em um nanogel de alginato e quitosana e obter efeito terapêutico superior ao produto comercial para tratamento de queimados. A doxorrubicina também já foi encapsulada com nanogel de alginato, e demonstrou ser sensível ao pH ácido, o que faz com que ela seja liberada principalmente nos ambientes ácidos tumorais (XUE *et al.*, 2015). Porém, nenhum dos exemplos acima utilizou o zinco como reticulante, desta forma, é válido continuar as investigações, que demonstram ser promissoras, sobre as diversas aplicações desses nanossistemas.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Obter nanodispositivos contendo própolis - nanofibras de zeína e nanogéis de alginato - para uso biomédico.

2.2 Específicos

- Determinar a biocompatibilidade, o potencial citotóxico e a capacidade de interferir na migração celular frente às células tumorais e não-tumorais da fração apolar da própolis pré-caracterizada.

- Obter nanofibras de zeína contendo própolis, caracterizar as suas propriedades físico-químicas e determinar a sua biocompatibilidade e citotoxicidade para possível aplicação no tratamento de melanoma.

- Obter nanogéis de alginato, reticulados com zinco, contendo extrato de própolis e conhecer o perfil de liberação para fazer a liberação modificada da própolis em meio fisiológico.

3. METODOLOGIA

3.1 Obtenção do Extrato de Própolis e Análise Química por GC-MS

A própolis foi coletada no meliponário localizado da Universidade Regional de Blumenau (FURB), localizada em Blumenau – SC. Para a obtenção do extrato da própolis a amostra original foi pulverizada, e macerada em diclorometano num frasco de vidro. O frasco foi deixado em câmara escura durante 3 a 4 dias com agitação ocasional. O extrato foi filtrado em funil de Büchner e o solvente foi removido com o auxílio de uma bomba à vácuo. Após esse processo, obteve-se um pó, que foi armazenado em recipiente âmbar e mantido no dessecador à vácuo.

As determinações cromatográficas foram realizadas por um cromatógrafo a gás, modelo GCMS2010 Plus (Shimadzu®, Japão), hifenado a um espectrômetro de massas em tandem do tipo triplo quadrupolo TQ8040 e auto amostrador AC 5000. Uma coluna de fase estacionária de 5% fenil-metilpolisiloxano, SH-Rtx- 5MS - Agilent® (30 m x 0,25 mm; 0,25 µm), e gás hélio 5.0 como gás de arraste foram empregados nas análises. O segundo e terceiro quadrupolos (q2 e q3) foram usados, nesse trabalho, apenas como focalizadores, uma vez que não foi avaliado o modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM). Desta maneira a seleção dos íons e fragmentos com específicas razões m/z foram realizadas no primeiro quadrupolo (q1).

A metodologia empregada consiste em uma rampa de aquecimento com início à 60°C por 5 minutos, com aumento de 5°C min⁻¹ até 200°C, seguindo 3°C min⁻¹ até 300°C, perfazendo um total de 72 minutos de análise. A temperatura do injetor foi de 250°C. O volume de amostra injetado foi de 1 µL aplicando-se o modo de injeção split na razão de 1:10, fonte de íons à 250°C, interface à 280°C e vazão de gás hélio a 1 mL min⁻¹.

O extrato da própolis obtido previamente foi reconstituído em diclorometano grau HPLC na concentração de 0,3 mg mL⁻¹ previamente à injeção no sistema GC-MS. As injeções foram feitas em triplicata e, com intuito de conferir a satisfatória precisão e exatidão analítica, o composto trifenilfosfato foi adicionado nos *vials* contendo o extrato final, atuando como padrão interno, em concentração fixa de 1 µg mL⁻¹. Dessa forma, pôde-se monitorar a performance da coluna. Os dados cromatográficos e espectrais foram analisados através do software GCMS Solution®, no modo *fullscan* m/z 45 – 500. A elucidação dos compostos foi realizada por similaridade (acima de 87%) dos espectros de massa de cada pico identificado no cromatograma, através da biblioteca NIST/EPA/NIH 2014.

3.2 Determinação das Atividades Biológicas da Própolis

As atividades biológicas da própolis foram testadas em colaboração com o Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do departamento de Biologia Celular da UFPR sob orientação da Prof.^a Dra. Carolina Camargo de Oliveira.

3.2.1 Viabilidade Celular – Incorporação do Corante Vermelho Neutro (VN)

A retenção intracelular do VN depende da capacidade da célula para manter gradientes de pH, através da produção de ATP. Em pH fisiológico, o corante apresenta uma carga líquida próxima a zero, o que permite que ele difunda livremente através das membranas da célula. Dentro dos lisossomos, há um gradiente de prótons para manter um pH menor do que o do citoplasma. Assim, o corante é protonado e retido dentro dos lisossomos (REPETTO; PESO; ZURITA, 2008). Dessa forma, o método mostra a viabilidade/integridade das endomembranas. Após a solução de extração, o corante eluído pode ser quantificado por medida de absorvância de UV-Vis em 540 nm.

A células das linhagens B16-F10 (BCRJ, 0046) e Balb/3T3 (clone A31, ATCC, CCL-163) foram cultivadas em garrafas de 25 cm² (Sarstedt) em meio Eagle Dulbecco modificado (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB, a 10%) e mantidas em incubadora a 37°C, 5 % CO₂. Após atingir de 70% a 80% da confluência, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) a 37°C, desaderidas quimicamente com tripsina (Gibco), contadas em Câmara de Neubauer, e plaqueadas em placas de 96 poços (Sarstedt). Empregou-se 500 células por poço para linhagem B16-F10 e 2000 células por poço para a linhagem Balb/3T3. Após 24 horas (h), essas foram tratadas com o extrato de própolis em dimetilsulfóxido (DMSO) (todos na mesma concentração de DMSO e de maneira que o volume final do poço tivesse 0,5% de DMSO) nas concentrações de 0, 5, 1, 10, 30, 50, 100 e 166 µg mL⁻¹, por 72 h. Como controle foram utilizados alguns poços contendo apenas DMSO na mesma concentração utilizada para diluição dos extratos. Após 72 h, o meio de cultura foi removido e as células (exceto branco) foram incubadas com 100 µL de uma solução de corante VN (concentração) em DMEM sem SFB. Após 2 h de incubação, o conteúdo dos poços foi desprezado e o corante incorporado pelas células foi eluído com 100 µL de uma solução de ácido acético glacial e álcool absoluto (1%/50%) em água, procedendo para a leitura de absorvância de UV-Vis em leitor de microplacas em 540 nm (Biotek Epoch).

Para as análises estatísticas foi utilizada a análise ANOVA e pós teste de Dunnett pelo software GraphPad Prism®.

3.2.2 Proliferação Celular – Coloração com Cristal Violeta (CV)

Esse ensaio foi realizado conforme GILLIES et. al (1986) com modificações. O experimento de proliferação celular através do método de CV permite obter dados quantitativos em relação à densidade celular presente em monocamadas de células cultivadas. O CV possui afinidade por ácidos nucleicos, especialmente DNA, e após a eluição e leitura de absorvância do corante é possível estabelecer uma relação direta entre a absorvância e o número de células presentes. Esse experimento pode ser feito na mesma placa em que foi feito o teste de viabilidade celular com o corante VN. Portanto, após finalizar a leitura desse teste, a solução de extração do vermelho neutro foi removida e a placa foi cuidadosamente lavada com água. As células (exceto branco) foram coradas com 100 µL da solução de cristal violeta 0,025% (Sigma) em água. Após 20 minutos a solução foi removida, a placa foi lavada com água e o corante foi eluído com 100 µL de solução de ácido acético glacial (Dinâmica) 33% em água ultrapura, procedendo-se então para a leitura da absorvância de UV-Vis em leitora de microplacas em 570 nm (Biotek Epoch).

Para as análises estatísticas foi utilizada a análise ANOVA e pós teste de Dunnett pelo software GraphPad Prism®.

3.2.3 Teste de Migração Celular (*Scratch-test*)

Para avaliar a dinâmica de migração celular, empregou-se o método de Scratch (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Esse método é baseado na criação de um risco (*scratch*) em uma monocamada de células com características aderentes. O risco tem por objetivo perturbar a monocamada de células dando o estímulo para que elas se movam no sentido de fechar a abertura feita e reestabelecer as interações célula-célula.

Com o objetivo de avaliar a capacidade da própolis estimular e/ou inibir a migração celular das células Balb-3T3 e das células B16-F10 e assim, determinar a sua ação cicatrizante ou de inibição de metástases, foi realizado com ambas as linhagens celulares o teste de *scratch*.

Para isso foram distribuídas em uma placa de 96 poços $4,5 \times 10^4$ células Balb-3T3 e em outra placa, 750 células B16-F10 por poço em meio DMEM suplementado com SFB e mantidas em incubadora a 37°C com 5% CO₂. Após 24 h, essas foram tratadas com o extrato de própolis em DMSO (todas na mesma concentração de DMSO e de maneira que o volume final do poço tivesse 0,5% de DMSO) nas concentrações de 0, 5, 5 e 15 µg mL⁻¹ durante 72 h. Como controle de crescimento foram utilizados poços contendo somente o meio de cultura com SFB e como controle de veículo utilizou-se o DMSO a 0,5%. Após 72 h, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com uma solução de mitomicina a 10 µg mL⁻¹ em 100 µL DMEM sem SFB. Após 2 h de incubação, o conteúdo

dos poços foi desprezado. Em seguida foi feito um risco no fundo de cada poço, utilizando para isso uma ponteira de plástico de pipeta de 10 μL . Para a remoção das células que se descolaram do fundo da placa os poços foram lavados 2 vezes com meio sem soro. Ao final acrescentou-se a cada poço 200 μL de meio sem soro. A partir daí iniciou-se o período de observação da migração celular por um período de 24 h. Em tempos pré-determinados (0, 16 h, 20 h e 24 h), foram tiradas fotos de cada poço em um microscópio óptico invertido, utilizando a objetiva de pequeno aumento (10x) as quais foram analisadas posteriormente com auxílio do software ImageJ® e do plugin *wound healing*. Os resultados foram analisados em termos de porcentagem do fechamento do risco e as análises estatísticas foram feitas utilizando a análise ANOVA e pós teste de Dunnett com auxílio do software GraphPad Prism®.

3.3 Produção das Nanofibras de Zeína e Própolis

O desenvolvimento das fibras de zeína foi iniciado durante o doutorado sanduíche em colaboração com o Instituto de pesquisa CNR Nanotec localizado na cidade de Lecce, Itália, sob orientação da Dra. Loretta del Mercato. Após o retorno ao Brasil as fibras foram produzidas no Laboratório de Inovação em Tecnologia de Sensores (LITS), localizado no departamento de Física da UFPR sob supervisão do professor Dr. Cyro Ketzer Saul.

Para confecção das fibras muitos parâmetros podem ser variados, a distância entre a ponta da agulha e o coletor e a voltagem aplicada entre esses dois pontos, a viscoelasticidade da dispersão que é determinada pela concentração do material utilizado, o solvente utilizado e o fluxo aplicado à bomba de seringa.

Com base em literatura prévia (MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2018), partiu-se das concentrações de 20, 25, 30 e 35% de zeína (m/v) que foram diluídas em diferentes soluções hidroalcolólicas (etanol 55, 70 e 90 m/m). As soluções foram deixadas sob agitação magnética por 1 hora, sob temperatura ambiente antes de serem utilizadas.

Uma seringa de 1 mL com agulha sem ponta de 21 gauge foi utilizada para acomodar as soluções na bomba de seringa. As condições experimentais foram extensivamente testadas até que se estabeleceu um padrão de fluxo de 0,2 mL h⁻¹, distância da ponta ao coletor de 15 cm, e voltagem aplicada que variou de 8 a 16 kV dependendo da dispersão utilizada.

Para analisar se as condições estavam sendo adequadas e fazer as otimizações necessárias, as fibras foram eletrofiadas durante 3 minutos sobre uma lamínula de vidro (2 x 2 cm) e analisadas em microscópio óptico utilizando objetivas de aumento de 20 e 40 vezes. O acompanhamento da formação das fibras foi feito por microscopia óptica. A quantidade de *beads* foi analisada e classificada de acordo com um sistema de cruzes (+) sendo uma cruz (+) para raros, duas cruzes (++) para poucos, e três cruzes (+++) para

muitos. O formato das fibras foi analisado pela continuidade e curvatura. O rendimento *versus* o tempo de aplicação também foi classificado pelo sistema de cruzes como baixo (+), bom (++) , ótimo (+++).

Para a incorporação da própolis, devido à sua solubilidade, foi utilizado como solvente etanol 90% (v/v) e zeína a 30% (m/v). As concentrações de própolis adicionadas variaram de 5, 10, 15, 20 e 25% em relação à massa seca de zeína. A partir daqui as amostras receberam siglas para facilitar a sua identificação, sendo respectivamente chamadas de: z30, z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25. Uma vez que os parâmetros de *electrospinning* precisaram ser adaptados ao laboratório de trabalho, no Brasil, eles foram ajustados para: fluxo de 0,2 mL h⁻¹, distância do coletor de 15 cm, voltagem aplicada de 11 kV e tempo de deposição de 3 minutos para análise morfológica e 20 minutos para todos os demais testes.

Com a finalidade de dar maior resistência mecânica às fibras em meio aquoso, e evitar o uso de solventes tóxicos nesse processo, foi utilizada a técnica de *annealing*. Para isso, foram escolhidas 2 temperaturas diferentes (140°C e 160°C), com base na análise termogravimétrica (TGA) (ALMEIDA *et al.*, 2018; BRAHATHEESWARAN *et al.*, 2012), e na temperatura de transição vítrea (T_g) da zeína (GHANBARZADEH *et al.*, 2006; MADEKA; KOKINI, 1996) e 2 tempos diferentes (2 h e 4 h, respectivamente).

3.3.2 Caracterização das Dispersões de Partida de Zeína e Própolis

Após a otimização dos parâmetros de eletrofiação, como mencionado acima, foram escolhidas as formulações feitas em etanol 90% (v/v) e zeína 30% para a incorporação da própolis. Desta maneira, para entender o comportamento reológico da dispersão polimérica e para elucidar a interação existente entre a própolis e a zeína, foram estudadas as características das soluções de partida das fibras, contendo zeína a 30% e diferentes graduações de própolis. Foram feitos testes reológicos rotacionais-oscilatórios e as técnicas de dicroísmo circular, potencial Zeta e tensão superficial.

3.3.2.1 Determinação da Viscosidade das Dispersões de Zeína 30% e Zeína 30% com Própolis em Etanol 90%

Para as análises reológicas foi empregado o um reômetro Anton Paar, modelo MCR 72 com o sensor de geometria cone-placa de 25 mm (CP25-1) na temperatura de 25 °C. Para a obtenção da curva de fluxo foram usadas dispersão de zeína a 30% e para cada concentração de própolis (5,10, 15, 20 e 25%) adicionada com taxa de cisalhamento de 0,1 a 100 s⁻¹ e de 100 a 0,1 s⁻¹. Foram coletados 50 pontos num tempo total de análise de 270 segundos.

3.3.2.2 Dicroísmo Circular

O DC foi realizado com o objetivo de elucidar o comportamento estrutural secundário da zeína no solvente etanol 90% (v/v), bem como, acompanhar as interferências geradas pela adição da própolis à dispersão de zeína. Os resultados obtidos com essa técnica podem auxiliar no entendimento da morfologia das fibras obtidas.

As análises de dicroísmo circular foram realizadas no departamento de bioquímica, sob supervisão da Dra. Flavia Lada Degaut Pontes. Inicialmente a zeína foi diluída a 1 mg mL⁻¹ em etanol 90 (v/v), seguindo de nova diluição 1:20 diretamente na cubeta. Uma segunda análise foi feita adicionando própolis à dispersão de zeína em etanol 90 (v/v), mantendo-se a relação de massas feitas quando do preparo das soluções de *electrospinning* (5, 10, 15, 20 e 25 m/m% de própolis em relação à zeína). As medidas foram realizadas em instrumento Jasco J-815, varredura entre 250 e 195 nm, utilizando cubeta de quartzo polido de duas faces, nas seguintes condições experimentais: baixa sensibilidade, 3 acumulações, largura de banda de 1 nm e resolução de 0,2 nm.

3.3.2.3 Tensão Interfacial – Método da Gota Pendente

Para a determinação da tensão interfacial foram preparadas soluções de zeína e de zeína com própolis (as mesmas utilizadas no *electrospinning*) as quais tiveram a sua densidade determinada previamente. Para isso, pesou-se em triplicata 1 mL de cada dispersão em um béquer e dividiu-se a massa obtida pelo volume. O software Opendrop[®] foi empregado para as medidas de tensão interfacial, para o qual foi necessário informar a força da gravidade (9,78 m s⁻²), a densidade do ar (1,2 kg m⁻³) e a densidade de cada amostra. Um tensiômetro da empresa Nova Pesquisa Química foi utilizado e calibrado com água ultrapura, no qual 1 mL de cada dispersão foi acondicionado em uma seringa de vidro acoplada a uma agulha sem ponta de 0,8 mm de diâmetro externo. A gota formada foi fotografada e teve o valor tensão determinado. A análise estatística foi feita com o teste de ANOVA calculada pelo software GraphPad Prism[®].

3.3.2.4 Potencial Zeta

O potencial Zeta foi medido pela técnica de microeletroforese a laser Doppler a 25°C usando o instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK) e determinado em triplicata a partir de uma média de 30 leituras com base na aproximação de Hückel (cP -1,0660, IR = 1,362 e constante dielétrica = 29,7). As análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Regional de Blumenau (FURB)

sob supervisão da Dr.^a Lizandra Zimmermann. Inicialmente a zeína foi diluída a 1 mg mL^{-1} em etanol 90 (v/v), em seguida, mantendo-se a relação de massas feitas quando do preparo das soluções de *electrospinning*, foram adicionados 5, 10, 15, 20 e 25 % de própolis em relação à massa de zeína.

3.3.3 Caracterização das Fibras

3.3.3.1 Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflexão Total Atenuada (FTIR-ATR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para caracterização inicial das fibras foram feitas análises de FTIR e MEV. Essas análises serviram como direcionamento para as demais caracterizações.

Os espectros de FTIR foram obtidos no Departamento de Ciências Exatas e Educação da UFSC - Campus Blumenau em Espectrofotômetro FT-IR Perkin Elmer Frontier por Refletância Total Atenuada. As leituras foram realizadas a 25°C em uma janela de número de onda de 450 a 4000 cm^{-1} , a um total de 16 acumulações e resolução de 1 cm^{-1} .

As imagens de MEV das amostras feitas com zeína a 25% e 30% em etanol 70% e 90% (z25et70, z25et90, z30et70 e z30et90) foram feitas no Instituto Carlos Chagas e todas as demais imagens (z30, z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR. Para isso, pequenos pedaços das lamínulas com fibras depositadas foram colados em suportes e recobertos com 4 nm de ouro, e observadas por um microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6360 (JEOL[®]), operando em 10 kV.

3.3.3.2 Ângulo de Contato – Método da Gota Sésil

Para determinar características da superfície formada pelas fibras foram realizadas medidas de ângulo de contato em um goniômetro desenvolvido pela empresa Nova Pesquisa Química com auxílio do software ImageJ[®]. Uma gota de água foi depositada sobre a superfície das fibras e foi fotografada em 30 segundos, tempo necessário para a estabilização da gota. Foram obtidas 10 medidas dos ângulos direito e esquerdo para cada amostra.

3.3.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) é um método de análise térmica no qual são produzidas curvas que medem uma variedade de parâmetros termodinâmicos e cinéticos (YUAN *et al.*, 2022).

Para essa análise foi empregado o equipamento NETZSCH DSC 200F3. Massas conhecidas das amostras foram pesadas e acondicionadas em cadinho de alumínio da mesma marca do equipamento, o qual foi furado e lacrado com o auxílio de uma prensa. Exceto para a amostra de própolis, fez-se uma corrida prévia das amostras de 0-100°C, com taxa de aquecimento constante de 10°C por minuto e mantido a 100°C durante 3 minutos para a remoção da água. Em seguida resfriou-se a amostra até -10°C seguido de aquecimento até 300°C com taxa de aquecimento e resfriamento constante de 10°C por minuto e vazão de gás nitrogênio de 40 mL min⁻¹. Os cálculos de variação de entalpia de fusão das amostras foram feitos pela razão entre a área do pico e a massa pesada (g), calculada com auxílio do software Origin[®].

3.3.3.4 Quantificação da Própolis Incorporada às Fibras

Foram feitos estudos quantitativos da própolis efetivamente incorporada na fibra antes e após o tratamento térmico. Para isso, as fibras depositadas durante 20 minutos, em lamínulas quadradas (de 2 cm x 2 cm), foram imersas em um béquer contendo 3 mL de diclorometano durante 2 minutos, e rapidamente colocadas em contato com o banho ultrassônico para que houvesse completa desestruturação das fibras. Utilizando uma seringa de vidro, o conteúdo foi retirado do béquer e filtrado com filtro 0,22 µm para remoção completa dos grumos de fibras. Foi utilizado um espectrofotômetro Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis para a medida da absorvância em 236 nm. Os valores obtidos foram correlacionados com a concentração de própolis com auxílio de uma curva analítica, construída previamente utilizando a própolis em diclorometano. A equação da reta que melhor correlacionou os pontos foi $y = 0,03424 + 9,2163x$, $R^2 = 0,9991$ (Figura 11).

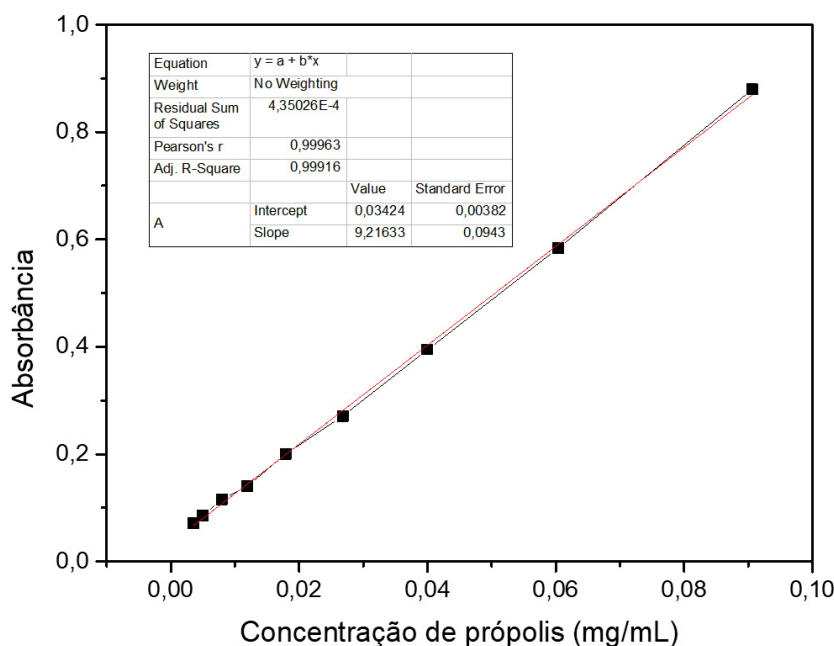


Figura 11 Curva analítica obtida com diversas concentrações de própolis em diclorometano. A leitura da absorvância foi feita em 230 nm.

Para análise estatística as amostras de mesma concentração de própolis foram comparadas entre si, quanto a quantidade de própolis presente nas fibras, antes e após o processo de reticulação, empregando-se para isto o teste de Mann-Whitney pelo software GraphPad Prism®.

3.3.3.5 Estudo de Biocompatibilidade das Fibras – Ensaio de MTT e Vermelho Neutro

O método do MTT foi realizado de acordo com a metodologia descrita por MOSMANN, (1983) e FOTAKIS & TIMBRELL, (2006). No ensaio de MTT, a presença de citotoxicidade celular é avaliada através da atividade da enzima succinato desidrogenase mitocondrial. Essa enzima tem a capacidade de clivar o anel tetrazólio do corante utilizado, formando um cristal insolúvel de formazan de cor roxa, o qual fica retido no interior da célula. Após a solubilização dos cristais em dimetilsulfóxido, obtém-se uma solução cuja absorvância é diretamente proporcional à atividade mitocondrial.

Para esse ensaio, as fibras feitas com zeína a 25% em etanol 70 e 90 (z25et70, z25et90), zeína a 30% em etanol 70 e 90 (z30et70 e z30et90) e as fibras z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25 foram depositadas sobre lamínula de vidro redondas de diâmetro de 13 mm. Após passarem pelo *annealing* o material foi esterilizado *overnight* sob luz UV em capela de fluxo laminar. Em seguida, as lamínulas contendo as fibras foram acondicionadas em uma placa de 24 poços. Sobre cada lamínula foram adicionados 100 µL de meio de cultura com soro fetal bovino contendo 3×10^4 células Balb/3T3. Como controle de crescimento celular foi utilizada uma lamínula de vidro de mesmo diâmetro sem

as fibras depositadas. A placa foi deixada em incubadora durante 1 h para completa adesão das células ao material. Em seguida, cada poço foi completado com mais 400 µL do mesmo meio de cultura. Após 72 h cada poço foi acrescido de 40 µL de solução de MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide* – Sigma®) e deixado em incubadora por mais 4 h. O meio de cultura foi então removido cuidadosamente e foram acrescentados a cada poço 400 µL de DMSO. A placa foi homogeneizada durante 20 min. Em seguida, todo o conteúdo da placa foi transferido para uma placa espelho e prosseguiu-se com a leitura no leitor de placas em 570 nm (Biotek Epoch®).

Para o ensaio de vermelho neutro, após 72h, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado o corante vermelho neutro previamente diluído em meio de cultura sem soro fetal bovino na proporção (1:79) conforme a ISO 10993-5:2009(E), (2009) e deixado na incubadora por mais 3 h. Após esse período o sobrenadante foi descartado e os poços foram novamente lavados com PBS. Procedeu-se com a eluição do corante com 900 µL solução extratora. A placa foi homogeneizada durante 20 min. Em seguida, todo o conteúdo da placa foi transferido para uma placa espelho e prosseguiu-se com a leitura no leitor de placas em 540 nm (Biotek Epoch®). As análises estatísticas foram feitas utilizando a análise ANOVA com pós-teste de Dunnett pelo software GraphPad Prism®.

Para análise da morfologia celular cultivada sobre as fibras, as células foram preparadas para o MEV. As amostras foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído (tampão cacodilato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,2), pós-fixadas durante 30 min em 1% OsO₄ no escuro à temperatura ambiente. Após as amostras foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio, e desidratadas através do aumento das concentrações de etanol (50 a 100% de etanol (v/v)). Em seguida prosseguiu-se com a desidratação através do ponto crítico de CO₂ e revestimento com ouro. As amostras foram analisadas, em pelo menos 10 campos diferentes, utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6360 LV.

3.4 Produção do Nanogel para Encapsulação da Própolis

3.4.1 Caracterização do Alginato de Sódio

O alginato de sódio, número de CAS 9005-38-3, lote SHMB2247, foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich®. Para conhecer a massa molar do alginato e proporção de ácidos manurônicos e gulurônicos presentes no lote utilizado durante a síntese do nanogel, foram feitas a determinação da massa molar ponderal média (\bar{M}_w) por cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (HPSEC) e a ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio.

3.4.1.1 Determinação da Massa Molar Ponderal Média (\bar{M}_w) por HPSEC

As análises de HPSEC foram realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFPR, em cromatógrafo equipado com detector de índice de refração diferencial (RI), modelo WATERS 2410, e com detector de espalhamento de luz laser com multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais acoplados em série. Utilizaram-se quatro colunas de gel permeação ultrahidrogel WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 g mol⁻¹, 4×10^5 g mol⁻¹, 8×10^4 g mol⁻¹ e 5×10^3 g mol⁻¹. Foram injetados 100 µL de amostra a um fluxo de 0,6 mL min⁻¹.

A amostra de alginato de sódio foi dispersada na concentração 1 mg mL⁻¹ em nitrato de sódio (NaNO₂) 0,1 mol L⁻¹ e 200 ppm de azida de sódio (NaN₃), solvente utilizado também como fase móvel. Antes de ser injetada no equipamento, a amostra foi filtrada com filtro Millipore de porosidade 0,22 µm.

A determinação do incremento do índice de refração (dn/dc) foi realizada usando um refratômetro diferencial Waters, modelo 2410. Para isso, cinco dispersões de alginato foram preparadas em diferentes concentrações (0,2 mg mL⁻¹; 0,3 mg mL⁻¹; 0,4 mg mL⁻¹; 0,5 mg mL⁻¹; 0,6 mg mL⁻¹) no eluente supracitado e filtradas com filtro Millipore de porosidade 0,22 µm.

Para interpretação dos dados e obtenção do valor da massa molar ponderal média (\bar{M}_w), utilizou-se o software ASTRA versão 4.70.07®.

3.4.1.2 Determinação da Razão M/G por RMN

Os espectros de RMN para as amostras de alginato foram adquiridos no Centro de Ressonância Magnética Nuclear da UFPR, no Departamento de Bioquímica e Biologia Celular em espectrômetro Bruker®, modelo AVANCE DRX-600MHz. As amostras foram dispersas em D₂O, em tubos de 5 mm, a concentração de 10 mg mL⁻¹. Os espectros de ¹H foram adquiridos a 70°C, com 128 *scans* e ácido trimetilsilil propiônico (TMSP) como padrão.

Para determinação da razão entre os ácidos manurônicos e gulurônicos (M/G) presentes no alginato foi utilizada a metodologia descrita por Jensen & col. (2015) (JENSEN, H. M; LARSEN, F. H; ENGELSEN, 2015), conforme a equação:

$$\frac{M}{G} = \frac{I_B + I_C - I_A}{I_A}$$

(equação 1)

Em que I_A corresponde à integral dos sinais de H1 das unidades de ácido gulurônico (região de 5,18 a 4,96 ppm), I_B corresponde a integral dos sinais de H5 das unidades de ácido gulurônico adjacentes a ácidos manurônicos (GM) e aos sinais de H1 das unidades de ácidos manurônicos (região de 4,82 a 4,57 ppm) e I_C corresponde a integral dos sinais de H5 de ácidos gulurônicos adjacentes a ácidos gulurônicos (GG) (região 4,55 a 4,38 ppm).

3.4.2 Síntese do Nanogel

Com base no trabalho publicado por PISTONE *et al.* (2013) com algumas adaptações, uma dispersão de alginato 0,05% (m/v) e uma solução de sulfato de zinco 1,7 mg mL⁻¹ foram preparadas em água ultrapura com NaCl 0,01 mol L⁻¹ com a finalidade de padronizar a força iônica. Com auxílio de uma bomba de seringa, 10 mL da solução de ZnSO₄ foram gotejados com fluxo de 2 mL min⁻¹ sobre a dispersão de alginato sob agitação magnética constante a 625 rpm e temperatura ambiente. Após o término do gotejamento a dispersão foi mantida sob agitação durante 40 minutos. Para o preparo do nanogel contendo própolis, o mesmo procedimento foi adotado. A própolis foi utilizada na relação 1:2 em relação a massa de alginato, dissolvida em 1 mL de etanol absoluto e adicionada na dispersão de alginato.

Uma parte do sobrenadante foi guardada para as análises de eficiência de encapsulação. Em seguida, as dispersões contendo o nanogel com e sem própolis foram dialisadas em uma membrana de 6000 KDa contra 1 litro de água ultrapura (4 trocas de água a cada 1 h) para remoção do NaCl e ZnSO₄ remanescentes na dispersão. Parte da dispersão final foi armazenada em tubos de plástico sob temperatura ambiente para posteriores análises, e outra parte foi liofilizada em equipamento Operon, modelo FDB-5503, o qual foi utilizado para as análises de FTIR-ATR e para a avaliação da capacidade de liberar a própolis encapsulada.

3.4.2.1 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Para acompanhamento da efetividade da síntese e estabilidade do nanogel obtido, as amostras analisadas quanto ao seu tamanho e carga durante 4 semanas. Essas análises foram feitas em instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK) no laboratório do CNR-Nanotec em Lecce-Itália. Para o DLS as amostras foram colocadas em cubetas de poliestireno e irradiadas com laser vermelho e as medidas foram tomadas a 25°C. O índice de refração e a viscosidade da água a 25°C foram usadas nos cálculos como parâmetros constantes. Uma função de correlação foi obtida de acordo com a intensidade de flutuação da luz espalhada num ângulo de 90°. O Software Zetasizer

Software (versão 5.02) calculou os diâmetros hidrodinâmicos das partículas segundo a equação de Stokes-Einstein. Foram obtidos a média de tamanho, o índice de polidispersão em relação ao número, bem como a intensidade de luz espalhada e a variação do tamanho.

O potencial Zeta foi medido pela técnica de microeletroforese a laser Doppler a 25°C usando o instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments Ltd., UK) e calculado em triplicata a partir de uma média de 20 leituras com base na aproximação de Smoluchowski. A constante dielétrica e a viscosidade foi a da água a 25°C.

Já no Brasil, as mesmas análises foram realizadas em equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., UK), localizado na FURB em Blumenau, utilizando os mesmos parâmetros descritos acima. Nessa ocasião, as amostras foram centrifugadas após a diálise, para remoção de agregados e acondicionadas em solução de KCl 0,001 mol L⁻¹.

3.4.2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura do Nanogel

Para obtenção de imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET), 10 µL da dispersão contendo o nanogel com própolis foram aplicados sobre um suporte de cobre (*grid*) revestidos com filme de *formvar* que melhora a aderência e estabilidade da amostra no *grid*. Os *grids* foram mantidos em dessecador até a realização das análises de MET. As imagens foram obtidas em diferentes pontos da amostra e realizadas no equipamento JEOL®, JEM 1200EX-II, operando a 80 kV.

Para as imagens de MEV, aplicou-se 10 µL das amostras sobre uma fita de cobre que foi colada sobre os suportes e deixada secar a temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi recoberta com 4nm de ouro, e observadas por um microscópio eletrônico de varredura modelo JSM-6360 (JEOL®), operando em 10 kV.

As imagens foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR e as medidas das partículas foram obtidas com auxílio do software ImageJ®.

3.4.2.3 Quantificação da Própolis Encapsulada no Nanogel

Para confirmar a quantidade de própolis contida no nanogel, 3 mL da dispersão contendo o nanogel foram filtradas com filtro de acetato de celulose 0,22 µm de forma a obter um sobrenadante livre de partículas. Prosseguiu-se com uma microextração líquido-líquido, 3 vezes com 1 mL de diclorometano, em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 236 nm. Previamente, foi construída uma curva analítica relacionando a absorvância em função da concentração de própolis em diclorometano. A equação da reta que melhor correlacionou os pontos é $y = 0,03424 +$

9,21633, $R^2 = 0,9992$. Desta forma, a eficiência de encapsulação pode ser calculada pela equação:

$$\% \text{ encapsulamento} = \frac{\text{massa total de própolis} - \text{massa de própolis no sobrenadante}}{\text{massa total de própolis}} \times 100$$

(equação 2)

3.4.2.4 Estudo do Perfil de Liberação da Própolis a Partir do Nanogel

O comportamento de liberação da própolis foi analisado sob duas diferentes condições: em tampão fosfato (PBS pH 7,3) e em tampão acetato (pH 5,4).

Para isso quantidades previamente pesadas (aproximadamente 2,5 mg) de nanogel liofilizado com quantidades conhecidas de própolis, foram acomodadas dentro de uma membrana de diálise de 6000 KDa, e estas foram colocadas em frascos fechados preenchidos com 10 mL dos tampões. Os tampões foram acrescidos do tensoativo dodecil benzoato de sódio (DBS) 0,01% (m/v) para garantir que as condições *sink* fossem atingidas. O sistema foi mantido sob agitação de 50 rpm e temperatura de 37°C. Em períodos pré-determinados (30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 24 h e 30 h) 400 µL do fluído foi coletado e a absorvância foi lida no UV-Vis em 236 nm. A amostra foi devolvida ao frasco de forma a evitar flutuação de concentração. Os cálculos da quantidade de própolis liberada para o meio foram feitos baseando-se na curva analítica construída para própolis nos tampões com DBS. A equação da reta que melhor se ajustou para o pH 7,4 foi $y = 0,96213x - 0,005$ ($R^2 = 0,9943$) e para o tampão de pH 5,3 foi $y = 1,32499x - 0,0225$ ($R^2 = 0,9898$).

Para melhor compreensão do mecanismo de liberação da própolis foram utilizados os modelos cinéticos não-lineares, de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas, os quais foram aplicados até o tempo 480 minutos. O modelo de melhor ajuste foi avaliado pelo coeficiente de determinação (R^2) e o desvio padrão dos parâmetros obtidos.

Para o modelo de primeira ordem foi utilizada a equação 3:

$$[EP] = [EP]_l + ([EP]_i - [EP]_l)^{-kt}$$

(equação 3)

Em que:

$[EP]$ = concentração de própolis no nanogel no tempo, t

$[EP]_i$ = concentração inicial de própolis no nanogel

$[EP]_l$ = concentração final de própolis no nanogel depois de 480 minutos

k = constante cinética de primeira ordem

Para o modelo de Korsmeyer-Peppas foi utilizado a equação 4:

$$\%EP = (EP\%)_i k_p t^n$$

(equação 4)

Em que:

$\%EP$ = teor percentual de própolis liberada no fluido receptor no tempo, t

$(EP\%)_i$ = teor percentual inicial de própolis no fluido receptor no tempo, $t = \text{zero}$

k_p = constante de Korsmeyer-Peppas

n = expoente de difusão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extrato de Própolis e Análise Exploratória da sua Composição via GC-MS

Para a obtenção do extrato de própolis foi utilizado, como solvente extrator, o diclorometano, pois com o uso desse solvente é possível concentrar os terpenos da própolis (COWAN, 1999; PRASHANT TIWARI; KUMAR; GURPREET KAUR, 2011). Após a filtração e completa remoção do diclorometano em equipamento à vácuo, o extrato foi analisado quanto à sua composição de compostos voláteis utilizando a técnica de GC-MS.

Através do cromatograma obtido (Figura 12) foi possível observar que a extração dos terpenos foi bem-sucedida e propiciou a identificação de um número bastante satisfatório de compostos, indicando a eficiência da etapa de extração empregada. Estão presentes diversos picos, dentre os quais foi possível identificar com base na biblioteca NIST, 27 moléculas diferentes dentre monoterpênicos, sesquiterpênicos e diterpênicos. Para a identificação dos compostos, foram consideradas satisfatórias similaridades acima de 87%. As moléculas, seu tempo de retenção (TR), a porcentagem de área absoluta e relativa, e razão m/z do sinal de maior intensidade (sinal base) são mostrados na Tabela 1.

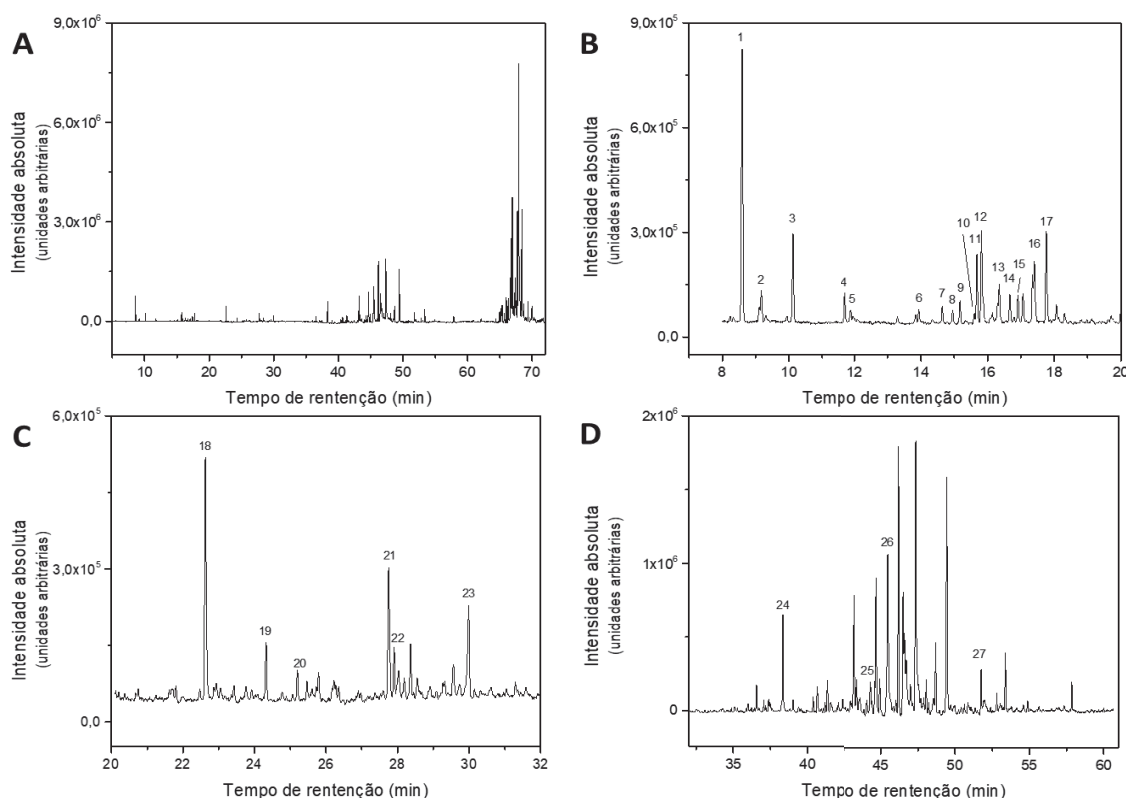


Figura 12. Cromatogramas obtidos por GC-MS da própolis.

A. Cromatograma inteiro TR de 5 a 72 min. B. TR 8 a 20 min. C. TR de 20 a 32 min e D. TR de 32 a 60 min. *Tags* numéricos dos picos identificados utilizando a biblioteca NIST. Os nomes de cada moléculas podem ser vistos na Tabela 1.

Tabela 1. Moléculas de Terpenos identificadas no extrato de própolis por GC-MS

TR (min)	Similaridade (%)	Tipo	Molécula	Área absoluta	Área rel. %	m/z
8,6	96	M	Alfa-pineno	2409254	11,28	93
9,1	92	M	Canfeno	104260	0,48	93
10,1	96	M	Beta-pineno	708711	3,34	93
11,7	94	M	Cimeno	194947	0,91	119
11,8	92	M	D-limoneno	52373	0,25	68
13,9	88	M	Fenchona	48406	0,23	81
14,6	86	M	Cis-verbenol	106986	0,48	109
14,9	88	M	Fenchol	60553	0,28	81
15,1	94	M	Alfa-canfolenal	119187	0,54	108
15,6	90	M	Nopinona	33576	0,15	83
15,6	92	M	L-pinocarveol	439655	2,04	92
15,8	92	M	Trans-verbenol	526613	2,41	109
16,3	91	M	Pinocarvona	116093	0,52	81
16,6	96	M	L-borneol	151923	0,69	95
16,9	91	M	4-terpineol	153457	0,70	71
17,3	94	M	Alfa-terpineol	138148	0,64	59
17,7	95	M	Levo-verbenona	710468	3,32	107
22,6	94	S	Alfa-copaeno	1285426	5,90	161
24,3	95	S	Aromadendreno	241626	1,10	161
25,8	95	S	Gama-muuroleno	104933	0,46	161
27,7	92	S	Spathulenol	843178	3,93	119
27,9	92	S	Óxido de cariofileno	170469	0,76	93
29,9	87	S	Mustakona	258289	1,19	147
38,3	88	D	13-Epimanool	2119363	9,86	137
44,6	87	D	Ferruginol	2275405	10,61	271
46,2	96	-	Trifenilfosfato (padrão)	6322969	--	326
47,3	92	D	Ác. dehidroabiético	7337206	33,96	285
51,7	91	D	Sugiol	878190	3,96	285

M = monoterpeno, S = sesquiterpeno, D = diterpeno

A classe dos terpenos representa um grupo de compostos orgânicos naturalmente produzidos pelas plantas, conhecidos como metabólitos secundários. Monoterpenos e sesquiterpenos são as moléculas mais representativas e constituem 90% dos óleos essenciais, apresentando grande variedade de estruturas derivadas da unidade isoprênica. Possuem relevantes propriedades farmacológicas como atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidante e cicatrizantes (BARRETO *et al.*, 2014; PÉREZ-RECALDE; RUIZ ARIAS; HERMIDA, 2018).

Como pode-se observar, muitos terpenos estão presentes na própolis. Algumas estruturas químicas das moléculas com maior abundância relativa estão exemplificadas na Figura 13. Com isso, vários mecanismos de ação são propostos para explicar a suas atividades terapêuticas e cicatrizantes, mas o que vários autores parecem concordar, é

que a sinergia entre os constituintes confere propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antioxidantes, as quais contribuem para a sua capacidade em auxiliar nos processos de regeneração tecidual (BETEG; STANCU; PASCU, 2019) e que uma vez separados podem até mesmo perder sua atividade (AMOROS *et al.*, 1992, 1994; BURIOL *et al.*, 2009; HOCHHEIM *et al.*, 2019; MARCUCCI, 1994).

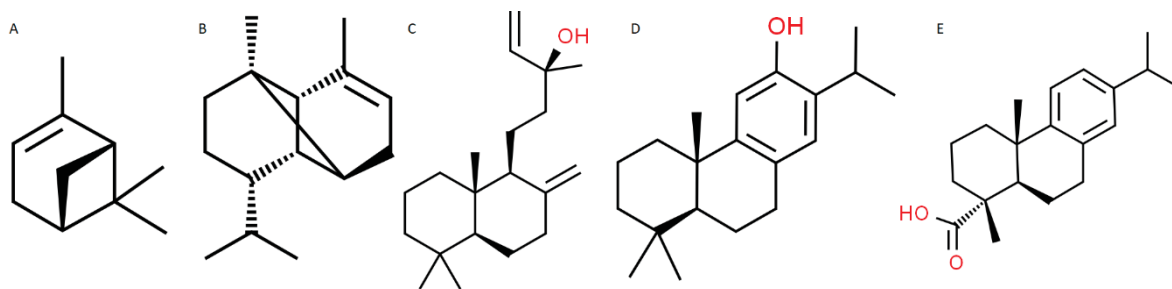


Figura 13 Moléculas de maior área relativa identificadas por GC-MS na própolis.
A: alfa-pineno, B: alfa-copaeno, C: 13-epimanol, D: Ferruginol, E: ácido dehidroabiético.
Fonte: Royal Society of Chmeistry, [s.d.]

4.2 Propriedades Biológicas da Própolis

Os testes de biocompatibilidade *in vitro* têm por objetivo simular as reações biológicas aos materiais e moléculas quando estes são colocados em contato com células e tecidos do corpo. Um dos primeiros passos para o desenvolvimento de biomateriais é a realização de testes de citotoxicidade utilizando linhagens celulares representativas de células normais, dessa forma é possível determinar as dosagens utilizadas em testes subsequentes (HANKS; WATAHA; SUN, 1996; PIZZOFERRATO *et al.*, 1994).

Esses testes são rotineiramente feitos, acessando a capacidade metabólica das células, as quais, bioquimicamente convertem substratos químicos em produtos, geralmente apresentando alteração colorimétrica e que podem ser convenientemente medidos em comprimentos de onda específicos utilizando um leitor de placas (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Outra forma de avaliar os efeitos tóxicos de uma substância é através da análise qualitativa das células. Podem ser avaliadas características como morfologia, vacuolização, descolamento do fundo da placa, lise e integridade de membranas das células. Nesse caso, são considerados efeitos tóxicos, quando as alterações qualitativas avaliadas comprometem 30%, ou mais, das células (INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5:2009(E), 2009).

Nesse estudo, optou-se por investigar a biocompatibilidade da própolis em células que se encontram na pele, como fibroblastos, uma vez que se objetiva o desenvolvimento de materiais cicatrizantes que estarão em contato com essas células. Também foi utilizada

a linhagem de células tumorais de melanoma B16-F10 com a finalidade de investigar a atividade antitumoral da própolis.

O método de vermelho neutro é um teste básico e amplamente aplicado na investigação da toxicidade de compostos. Ao se colocar a própolis em contato com as células pode-se ter uma ideia de como esse conjunto de moléculas irá afetar a viabilidade das membranas celulares já que, quando a célula está em processo de morte, as membranas perdem a capacidade de reter o corante dentro delas, e a absorvância resultante é consequentemente reduzida.

Após as células serem cultivadas até a confluência da monocamada celular, elas foram tratadas com diferentes concentrações de própolis em DMSO. A análise da morfologia celular foi feita a cada 24 h e o efeito alcançado foi analisado com o uso do espectrofotômetro após 72 h. Os resultados de ambas as linhagens podem ser vistos nos gráficos da Figura 14.

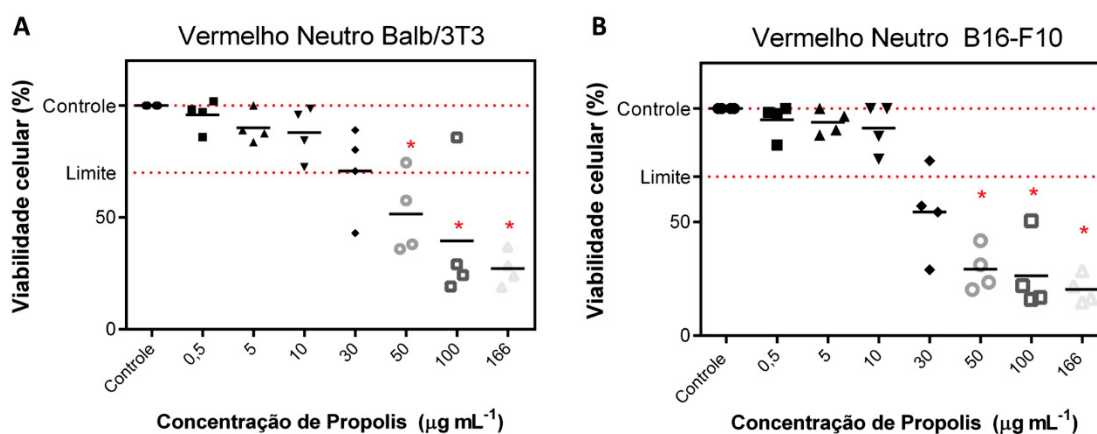


Figura 14 Viabilidade celular após tratamento com diferentes concentrações de própolis. Determinação em células A. Balb/3T3 e B. B16-F10.

Controle = 100% de viabilidade celular; limite = 70% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média de um experimento feito em quadruplicata, o risco representa a mediana de 4 experimentos independentes e o * representa diferença significativa em relação ao controle com base no teste ANOVA e Dunnet's pós teste.

Pela análise dos gráficos pode-se perceber que as concentrações de própolis até $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ com 72 h de exposição, não induziram perda de viabilidade para as linhagens celulares testadas em relação ao controle. Para concentrações maiores é possível ver um decaimento da viabilidade celular similar entre ambas as linhagens e de forma concentração-dependente, esse decaimento foi considerado significativo ($p < 0,05$), segundo a análise ANOVA, para as concentrações a partir de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os fibroblastos (Balb/3T3) e para as células de melanoma (B16-F10).

Para conhecimento das concentrações que inviabilizam 50% das células (IC_{50}) foram feitos os gráficos apresentados na Figura 15. Pode-se ver para a linhagem celular de fibroblastos a IC_{50} foi de $61,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para a linhagem de melanoma a IC_{50} foi de

36,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Isto configura um importante resultado, uma vez que sugere que a concentração de própolis necessária para diminuir a viabilidade de células de melanoma está bem abaixo da concentração necessária para danificar os fibroblastos. Sendo assim, a própolis pode ser uma candidata a testes mais aprofundados visando novas possibilidades para tratamento de melanoma sem que haja prejuízo das células normais da pele.

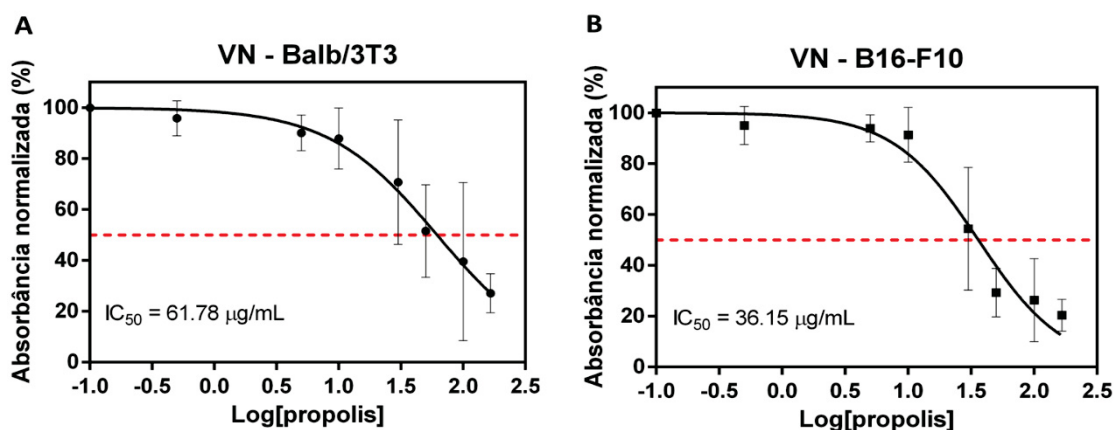


Figura 15 IC_{50} . IC_{50} da própolis frente a linhagem A. Balb/3T3 e B. B16-F10 calculadas a partir do ensaio de viabilidade celular com vermelho neutro. A linha tracejada em vermelho marca o ponto de 50%.

O teste de proliferação celular se baseia na capacidade do corante cristal violeta corar o DNA de células aderidas ao fundo da placa de cultivo celular. Ao expor as células aos agentes testados, elas podem proliferar, morrer e desaderir da placa de cultivo ou podem perder algumas de suas funções, sem, no entanto, perderem a propriedade de adesão, e assim, permanecem na placa. Dessa forma, esse teste é capaz de quantificar as células na monocamada e dar mais indícios sobre o mecanismo de ação dos compostos testados (VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

Após a eluição do corante cristal violeta com a solução extratora, fez-se a leitura de absorvância da placa, que é diretamente proporcional à quantidade de células na monocamada. Os resultados desse teste para ambas as linhagens celulares testadas podem ser vistos na Figura 16.

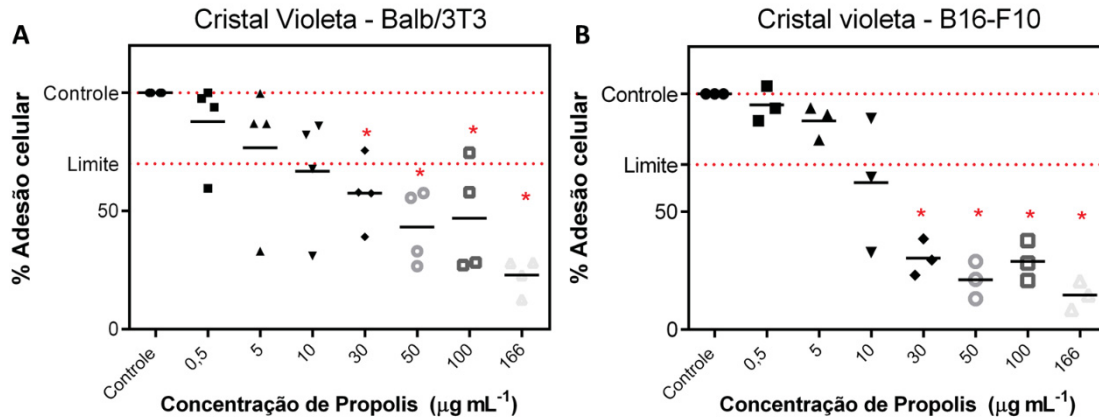


Figura 16 Densidade Celular após tratamento com diferentes concentrações de própolis. Determinação em células A. Balb/3T3 e B. B16-F10

Controle = 100% de viabilidade celular; limite = 70% de viabilidade celular. Cada ponto representa a média de um experimento feito em quadruplicata, o risco representa a mediana de ao menos 3 experimentos independentes e o * representa diferença significativa em relação ao controle com base na análise ANOVA e pós-teste de Dunnett.

Pela análise dos gráficos pode-se perceber que até a concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ não houve alteração na densidade tanto das células Balb/3T3 como das células B16-F10 aderidas ao fundo da placa após 72 h de exposição. Confirmando então a concentração estabelecida como segura no teste de viabilidade celular com VN. Pela análise estatística foi considerada significativa a diferença em relação ao controle ($p < 0,05$) a partir da concentração de $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas as linhagens celulares.

Teerasripreecha *et al.* (2012) avaliaram a atividade citotóxica de extratos feitos com diclorometano de uma amostra de própolis da Tailândia proveniente da espécie *Apis mellifera* contra várias linhas celulares normais e tumorais e descreveram valores de IC_{50} entre 43,8 e $53,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Calhelha *et al.* (2014) investigaram a atividade citotóxica do extrato etanólico de própolis contra linhagens de células tumorais e células hepatócitas normais (PLP2), sendo que a IC_{50} encontrada para PLP2 foi superior a algumas células tumorais como NCI-H460 (câncer de pulmão de células não pequenas) e HCT15 (carcinoma do cólon). O mesmo foi encontrado por Campoccia *et al.* (2021) que provaram que a própolis europeia é capaz de promover a morte das células tumorais, enquanto as células ósseas normais (hMSCs) possuíam IC_{50} mais elevadas (dentro de 258,3-287,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Ao avaliar as atividades terapêuticas da própolis, determinar IC_{50} em células normais é de extrema importância para prever e evitar efeitos secundários. Com os testes de VN e CV e o cálculo da IC_{50} foi possível determinar a concentração segura a ser utilizada, sendo um importante dado para os testes de migração celular.

O ensaio de migração realizado nesse trabalho é também conhecido como *wound healing assay*, ou *scratch assay*, pois um risco (*scratch*) é feito na monocamada celular, e então o seu fechamento é acompanhado, correspondendo a migração celular.

Quando realizado em células da derme, o ensaio é adequado para estudos sobre os efeitos das interações célula-matriz e célula-célula na migração celular, imitando a migração celular durante a cicatrização de feridas *in vivo* (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Em contrapartida, quando o ensaio de migração celular é feito com células tumorais, busca-se evidenciar modulações em uma das etapas mais críticas da progressão tumoral: a metástase – disseminação de células cancerosas para órgãos distantes do tumor primário – processo responsável pelo agravamento da doença (HULKOWER; HERBER, 2011).

Os resultados desse ensaio podem ser vistos na Figura 17 que mostra o fechamento do risco ao longo do tempo e a área aberta ao final de 24 h. Para os fibroblastos (Balb/3T3) a análise ANOVA não demonstrou diferença significativa entre as células que foram utilizadas como controle (veículo DMSO) em relação às células que foram tratadas com própolis nas concentrações de 0,5, 5 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ durante 72 h. Ao final do período de observação todas as condições testadas fecharam cerca de 53% do risco. Logo, pode-se dizer que a própolis nessas concentrações e nesse tempo não tem a capacidade de interferir na migração celular e promover o fechamento do risco.

Para as células B16-F10 pode-se ver que as concentrações de 0,5 e 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no período de 72 h não foram capazes de impedir que as células tumorais migrassem para o fechamento do risco, e tanto os controles (meio e veículo) permitiram 100% de fechamento do risco. Porém, na concentração de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a própolis interferiu de maneira significativa na migração celular de maneira a impedir o fechamento total do risco. Assim, pode-se dizer que, nessas condições, a concentração de 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$ poderia diminuir a metástase de células de melanoma.

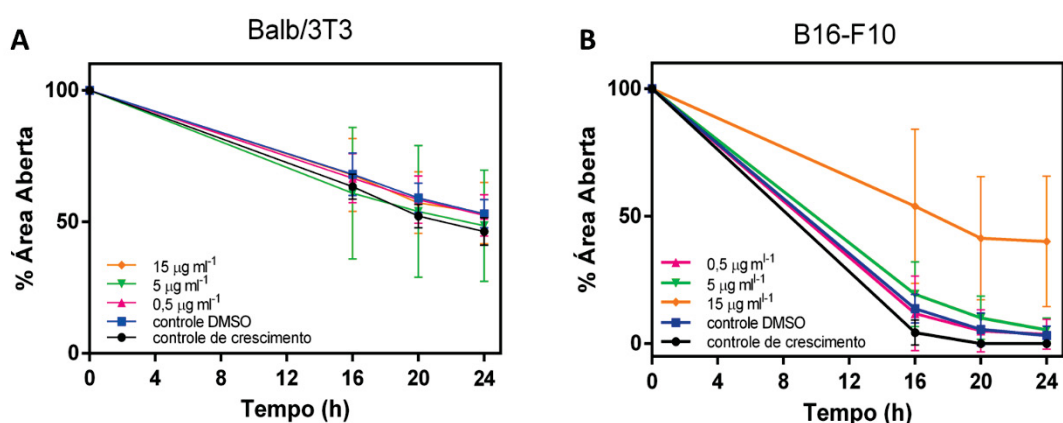


Figura 17 Migração Celular. A. células Balb-3T3 e B. Células B16-F10. Cada ponto representa a média de 5 poços analisados, e os experimentos foram feitos em triplicata.

Entre os receptores de membrana mais estudados para o entendimento da migração celular estão as integrinas e as caderinas, as primeiras responsáveis pela adesão e migração celular e a última pela interação célula-célula (RIBEIRO *et al.*, 2022). Porém,

para afirmar-se qual o mecanismo envolvido na inibição da migração celular, outros ensaios como a de marcação dessas proteínas teriam que ser realizados. Imagens representativas do ensaio de migração celular podem ser vistas na Figura 18 e na Figura 19.

Revisões bibliográficas recentes enfatizam que tanto o extrato de própolis como diversos componentes isolados da própolis possuem potencial para inibir a metástase tumoral via inibição de fatores de crescimento e aumento da expressão de caderinas e supressão das integrinas (ELUMALAI *et al.*, 2022; ORŠOLIĆ; JAZVINŠČAK JEMBREK, 2022).

Em um trabalho realizado por Fri *et al.* (2020), os autores isolaram o componente Nemorosona da própolis, e através de técnicas de imunocitoquímica comprovaram que tal componente é capaz de aumentar a expressão de e-caderinas. Em particular, as e-caderinas são importantes reguladoras do processo de metástase, e sua expressão diminui quando as células epiteliais perdem a aderência celular e adquirem uma agressividade e fenótipo invasivo (FRI *et al.*, 2020).

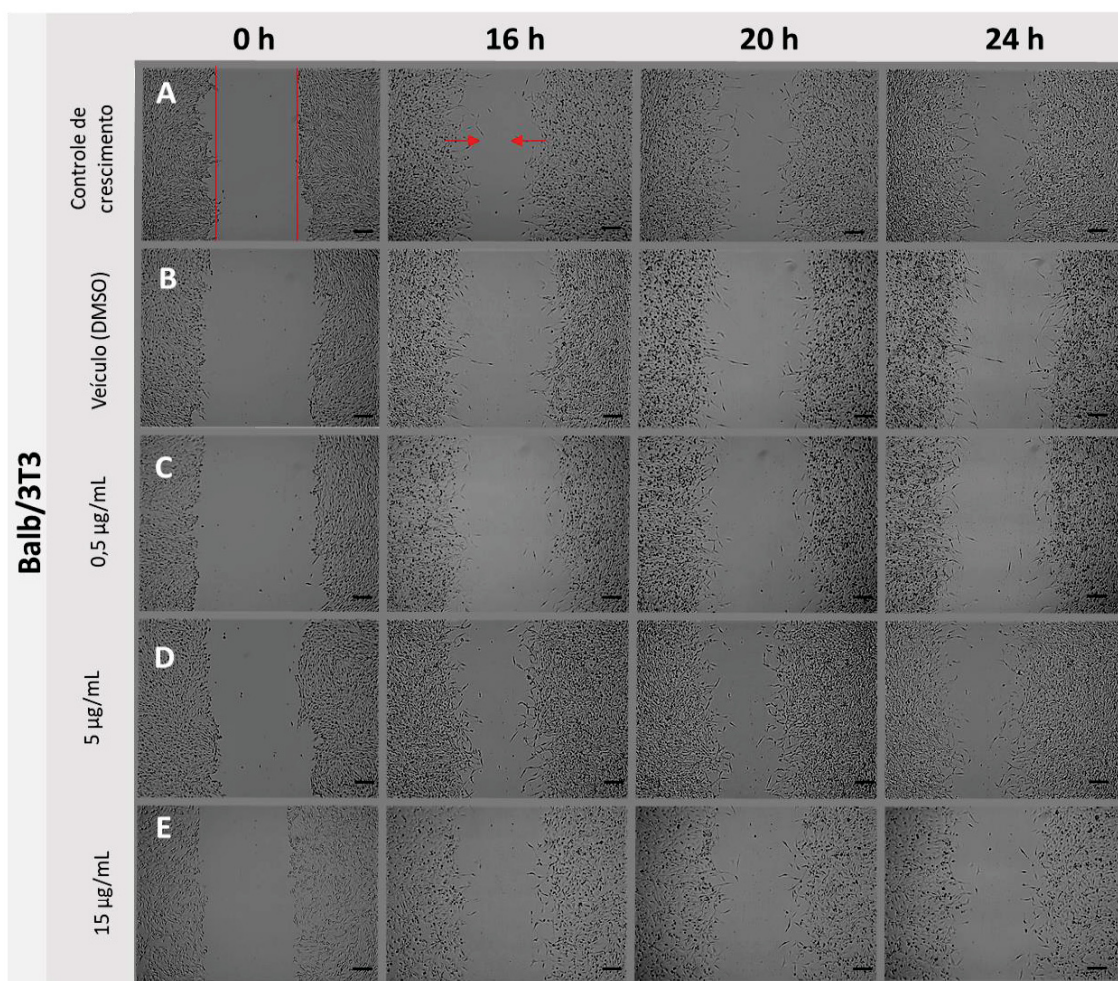


Figura 18 Migração celular. Imagens representativas do acompanhamento do ensaio de migração celular das células Balb/3T3 feito em microscópio óptico invertido nos tempos de 0, 16h, 20h e 24h com concentração de própolis de 0,5 µg/mL, 5 µg/mL e 15 µg/mL. A barra de escala representa 500µm.

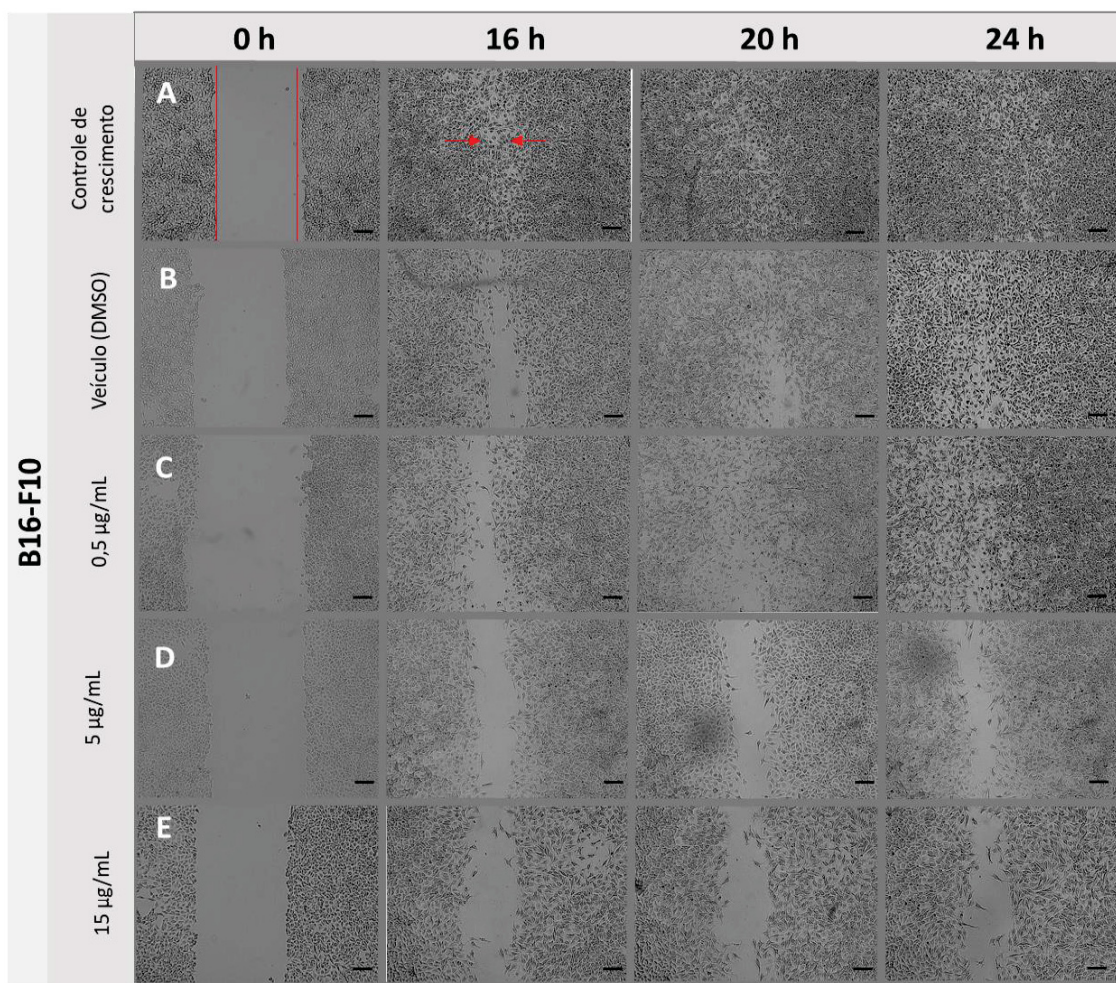


Figura 19 Migração celular. Imagens representativas do acompanhamento do ensaio de migração celular das células B16-F10 feito em microscópio óptico invertido nos tempos de 0, 16h, 20h e 24h com concentração de própolis de 0,5 µg/mL, 5 µg/mL e 15 µg/mL. A barra de escala representa 500µm.

4.3 Nanofibras de Zeína e Própolis

4.3.1 Estudo da Interação entre a Zeína e a Própolis

Para elucidar o comportamento das cadeias poliméricas da zeína no solvente etanol 90%, bem como as interações que ocorrem entre a zeína e a própolis, foram feitos estudos sobre a viscosidade das dispersões e utilizadas as técnicas de dicroísmo circular, potencial Zeta e tensão superficial e os resultados são explicados a seguir.

Devido à viscosidade da dispersão a ser eletrofiada ser um importante parâmetro para a formação das fibras, buscou-se entender o comportamento reológico da dispersão formada por zeína a 30% e das misturas entre zeína 30% e as demais concentrações de própolis. Para isso uma curva de fluxo foi construída que está apresentada na Figura 20.

É possível perceber que a viscosidade das soluções de zeína aumenta quando a própolis é inserida na dispersão. Esse aumento é gradual até a concentração de própolis de 15%, sendo que as amostras z30p20 e z30p25 mostraram ser menos viscosas que a z30p15, porém, ainda foram mais viscosas que a dispersão formada apenas por zeína a 30%, demonstrando assim, que a própolis aumenta a viscosidade das dispersões.

Tanto a dispersão z30, como as amostras acrescidas de própolis mostraram um comportamento pseudo-plástico, isto é, aumentam sua fluidez (reduzem sua viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento) conforme a taxa de cisalhamento aumenta (AKINALAN BALIK; ARGIN, 2020).

Outra característica a ser observada nas curvas de fluxo, é a presença de certa área de histerese nas amostras z30 e z30p5, demonstrando que ao final do teste essas amostras estão mais viscosas. Para as demais amostras essa área diminui, demonstrando algum efeito da própolis nesse sistema, que auxilia na recuperação da viscosidade original. A histerese, para a reologia, está ligada a capacidade das amostras retomarem o seu estado original após cessar a taxa de cisalhamento, demonstrando assim, a recuperação conformacional do sistema (MEWIS, 1979). Para determinar mais características sobre o comportamento viscoelástico e sobre a tixotropia do material, seria necessário determinar os módulos de elástico (G') e viscoso (G'') e fazer testes de *creep recovery*, respectivamente (ANTON PAAR, 2022).

AMAN MOHAMMADI *et al.* (2021), fizeram fibras de zeína/ácido polilático/hidroxipropil metilcelulose e incorporaram 15 e 30% de óleo essencial de Ajowan nas soluções e puderam observar uma diminuição da viscosidade com o acréscimo do óleo, a qual favoreceu a obtenção e fibras de menor diâmetro. Sabe-se, portanto, que a viscosidade das dispersões é importante para o *electrospinning*, pois o aumento da viscosidade tende a formar fibras de maior diâmetro (AKINALAN BALIK; ARGIN, 2020). Nesse estudo, evidenciou-se que, com a adição de própolis, as dispersões tomam-se mais viscosas em relação à dispersão feita somente com zeína a 30%, sem interferir, no entanto, significativamente no tamanho desejado das fibras produzidas (resultados adiante).

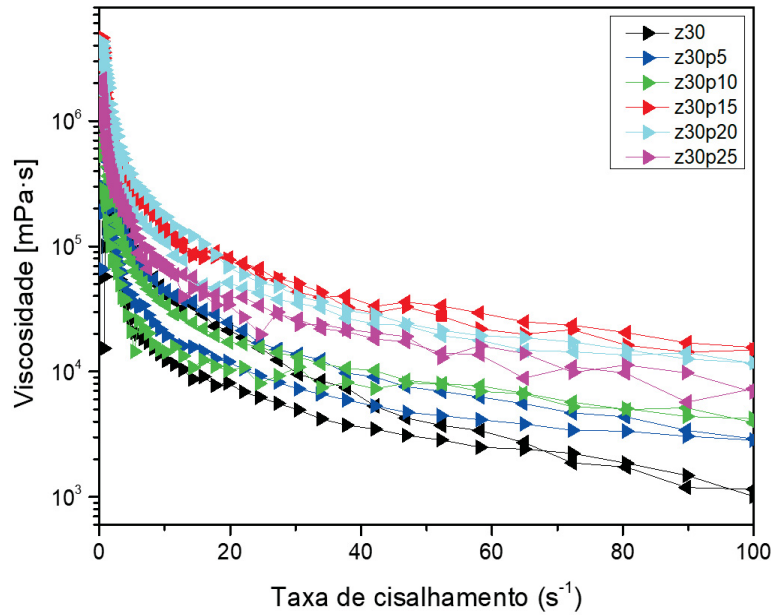


Figura 20 Curva de viscosidade das soluções de partida do *electrospinning*. Os símbolos \triangleright representam o aumento da taxa de cisalhamento e os símbolos \triangleleft representam a diminuição da taxa de cisalhamento.

Em relação ao dicroísmo circular, na Figura 21 A é possível observar as bandas formadas quando a zeína é preparada em etanol 90% (v/v). Forma-se uma intensa banda positiva em 200 nm e bandas negativas em 208 nm e 222 nm demonstrando o predomínio da sua estrutura α -hélice.

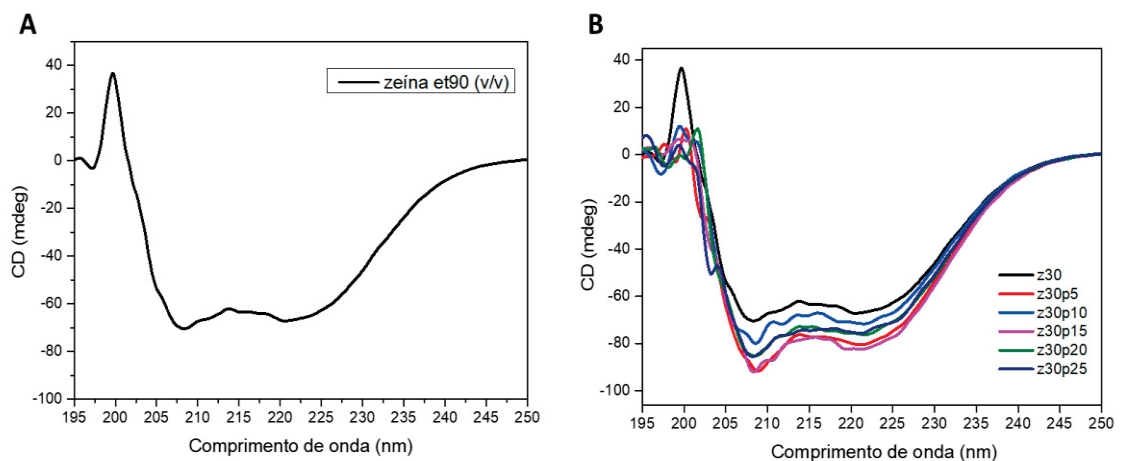


Figura 21 Espectro de dicroísmo circular
A: zeína 30% em etanol 90% (v/v) (z30) e B: zeína 30% com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25)

É possível observar que à medida que a própolis é adicionada à dispersão de zeína ocorre uma diminuição da intensidade da banda positiva, e um aumento na intensidade das bandas de máximo negativo sugerindo que mudanças estejam ocorrendo pela

interação da própolis com a zeína. Segundo Selling et. al (2007), a intensidade das bandas negativas é diretamente proporcional a quantidade de α -hélices presentes. ZHAO *et al.* (2022) comprovaram, utilizando DC, que a interação entre a zeína e o ácido elágico, reduz a polaridade da zeína, e isto foi evidenciado no espectro, pelo aumento da estrutura de α -hélice.

Neste trabalho, uma vez que se está analisando a fração apolar da própolis, sugere-se que a interação entre a estrutura da zeína e da própolis favoreça a conformação de α -hélice, porém, de forma que a própolis interaja com os aminoácidos apolares alanina, leucina, prolina e valina da zeína.

Para a determinação da tensão superficial, foi necessário medir a densidade das amostras previamente. Os resultados da densidade e os valores de tensão superficial podem ser vistos na Tabela 2 e na Figura 22, respectivamente. Como pode-se observar, a densidade da dispersão aumenta mesmo nas menores concentrações de própolis adicionada.

Tabela 2. Densidade das soluções de zeína 30% (z30) e zeína com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90 (v/v) a 25°C

Amostras	z30	z30p5	z30p10	z30p15	z30p20	z30p25
Densidade (g mL ⁻¹)	0,63	0,84	0,88	0,84	0,84	0,85

Pelo gráfico apresentado na Figura 22 pode-se perceber que a tensão superficial das amostras com própolis é significativamente maior ($p < 0,0001$ pela análise ANOVA) da amostra contendo apenas zeína. Os valores de tensão superficial maiores para as amostras contendo própolis, indicam que a superfície da gota pendente está se tornando mais polar. Sugere-se que a própolis esteja interagindo com a face hidrofóbica da zeína, e assim, deixando expostos na superfície da gota, a sua face mais polar. Isso pode ser explicado pela ótima interação existente entre a própolis e a zeína, a qual já foi relatada por outros autores (MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2018).

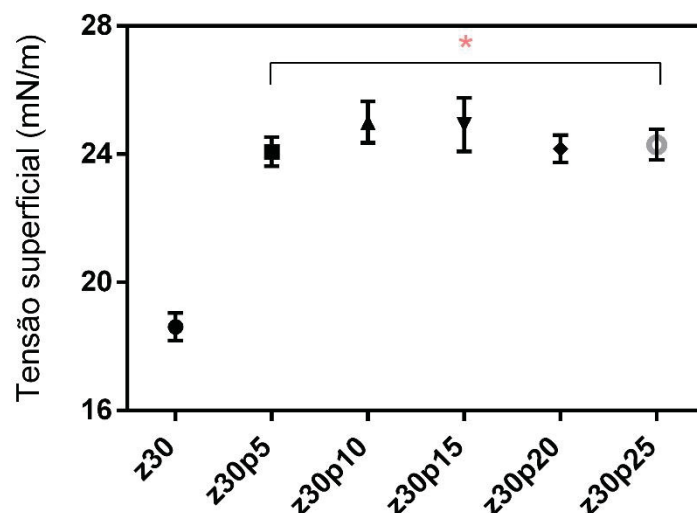


Figura 22 Tensão superficial das soluções de zeína 30% (z30) em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90% (v/v) a 25°C. Os pontos representam as médias das replicatas com o desvio padrão. O * representa a diferença significativa pela ANOVA em relação à amostra z30.

O resultado da tensão superficial também ajuda a explicar o fato de que quando a própolis está presente nas dispersões de zeína aumenta ocorre um maior rendimento da quantidade de fibra depositada, bem como uma maior uniformidade, evidenciada pelo menor número de *beads* formados devido às cadeias estarem mais intimamente conectadas na dispersão.

Para entender os fenômenos de densidade de carga, foi feita a análise de potencial Zeta e os resultados vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Potencial Zeta das dispersões de zeína 30%(z30) e zeína com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90% (v/v) a 25°C

	z30	z30p5	z30p10	z30p15	z30p20	z30p25
ζ (mV)	9,77	10,17	11,75	11,15	12,48	12,35

Pelos resultados obtidos foi possível perceber que a zeína possui carga positiva na dispersão em etanol 90% (v/v), estando de acordo com dados da literatura (DA SILVA *et al.*, 2020) e que esta carga vai ficando mais positiva de uma forma estatisticamente significativa ($p < 0,0001$ pelo ANOVA) conforme a própolis é adicionada a dispersão de zeína a 30%.

A análise do potencial Zeta é importante, pois para que a técnica de *electrospinning* funcione, e seja possível gerar fibras, é essencial que o polímero em dispersão tenha carga, assim, é possível dar início à formação do cone de Taylor, por onde parte a eletrofiação. Sabe-se ainda, que cargas uniformemente distribuídas e mais extremas, tanto positiva quanto negativamente, das partículas coloidais, são responsáveis pela estabilização dos

sistemas, pois causam repulsão entre as partículas, evitando a sua aglomeração (SUN et al., 2003). No *electrospinning*, porém, uma carga muito extrema, tornaria a repulsão entre as cadeias poliméricas muito grande, e não seria possível formar fibras (YALCINKAYA; YALCINKAYA; JIRSAK, 2016).

Com a utilização dos dados dessas quatro técnicas (curva de viscosidade, dielétrico, tensão superficial e potencial Zeta), foi possível perceber a boa interação entre a zeína e a própolis e que essa interação favoreceu a formação das fibras. Outro dado importante que se pode observar, é que a própolis, ao interagir com a zeína, acaba por deixar a carga superficial mais positiva à medida que se aumenta a concentração de própolis. Pode-se inferir assim, que os resíduos positivos, principalmente os grupos NH_3^+ dos aminoácidos da zeína tornam-se mais expostos. Essa constatação é importante pois irá auxiliar no entendimento da interação entre as células e as fibras, que será visto adiante.

4.3.2 Fabricação e Caracterização das Nanofibras de Zeína e Própolis

O *electrospinning* vem sendo aplicado com sucesso na área de engenharia de materiais devido às suas estruturas em nanoescala que podem mimetizar a matriz extracelular e facilitar a ancoragem de células na superfície das fibras. Devido à grande variedade de materiais que podem ser utilizados, muitas moléculas diferentes podem ser incorporadas nessas fibras, gerando diferentes sistemas de *drug-delivery* (DHANDAYUTHAPANI et al., 2011; YE et al., 2019).

No início do desenvolvimento desse trabalho vários testes foram feitos para determinar qual dos solventes (55%, 70% e 90%) e diferentes concentrações da zeína, entre elas 20%, 25%, 30% e 35% e parâmetros como a voltagem aplicada, o fluxo da bomba de seringa e a distância entre a ponta da seringa e coletor. Para acompanhamento da formação das fibras foram feitas imagens por microscopia óptica para definir os parâmetros a serem utilizados. Os resultados podem ser vistos no Apêndice I.

Os resultados vistos na análise por microscopia óptica foram importantes para direcionar a escolha das condições de eletrospinning e com base na literatura foi possível correlacionar os achados com maior segurança. Após essa análise, foram escolhidas as concentrações de zeína a 25 e 30% em etanol 70% e 90%, para fabricação de fibras em maior quantidade e para realizar algumas imagens de MEV (Figura 23) e os testes de biocompatibilidade (MTT) (resultados adiante).

Na Figura 23 podem ser visualizadas algumas imagens representativas das fibras após o tratamento térmico. Pode-se perceber sua morfologia contínua e sem *beads*. Também nas imagens de menor aumento, pode-se perceber que o material apresenta alguns grumos de material que ocorrem devido a deposição não homogênea das fibras sobre a lamínula.

A formação de *beads* é indesejada pois esse acúmulo de material reflete a falta de uniformidade na deposição. Esse problema pode ser minimizado ao se trabalhar com soluções de maior viscosidade que tendem a diminuir a quantidade e tamanho dos *beads*, mas acabam por gerar fibras com maior diâmetro (COLLINS; FEDERICI; CATALANI, 2012; LIU *et al.*, 2008; MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2018; YAO; LI; SONG, 2006)

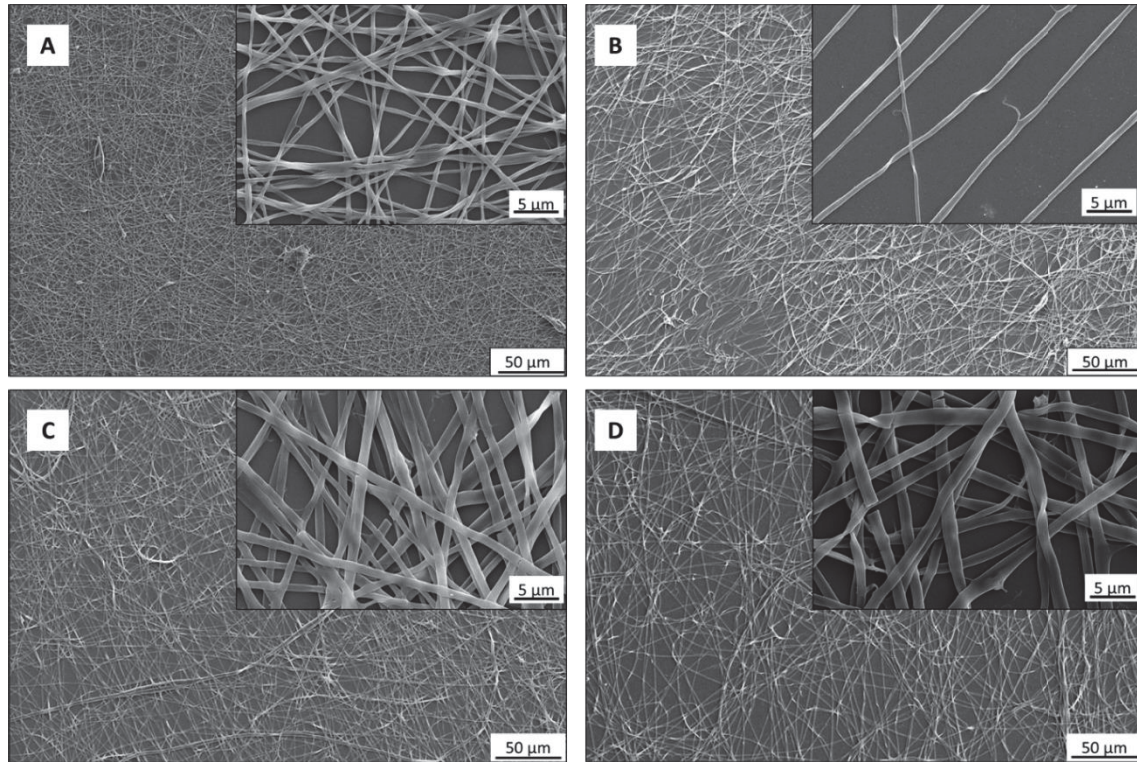


Figura 23 Imagens de Microscopia eletrônica de varredura das amostras
A: zeína 25% em etanol 70%, B: zeína 25% em etanol 90% C: zeína 30% em etanol 70% e D: zeína 30% em etanol 90, após o *annealing* de 4 h a 160°C, em aumento de 300 e 3500x.

As imagens de MEV feitas no Instituto Carlos Chagas, foram bastante relevantes para que se pudesse observar com maior detalhamento a formação e morfologia das fibras. O formato das fibras assemelha-se ao de uma fita, tal morfologia é chamada na literatura de *ribbon-like*. Essa formação é característica das fibras de zeína quando a dispersão é feita em etanol (KHATRI *et al.*, 2020; MORADKHANNEJHAD *et al.*, 2018).

Com auxílio do Software ImageJ[®] foi possível medir os diâmetros das fibras. Os resultados estão representados graficamente na Figura 24. Como já discutido anteriormente, já é bem conhecido que o aumento concentração polimérica aumenta o diâmetro da fibra. Também foi possível observar que entre as soluções de mesma concentração, o solvente utilizado exerce efeito sobre o diâmetro das fibras, sendo que o etanol 90%, tende a deixá-las com maior diâmetro. Esse resultado está descrito na literatura e pode ser relacionado com a taxa de evaporação do solvente que é maior quanto maior for a graduação de etanol (CHOI; KIM; YEUM, 2011). Quando o solvente evapora

muito rapidamente (*dewetting*) as cadeias poliméricas podem sofrer o efeito de captura cinética de uma fase metaestável, isto é, adquirem como que uma conformação “congelada” pela evaporação do solvente num curto espaço de tempo. Dessa forma, perdem sua mobilidade e não conseguem se acomodar numa estrutura organizada.

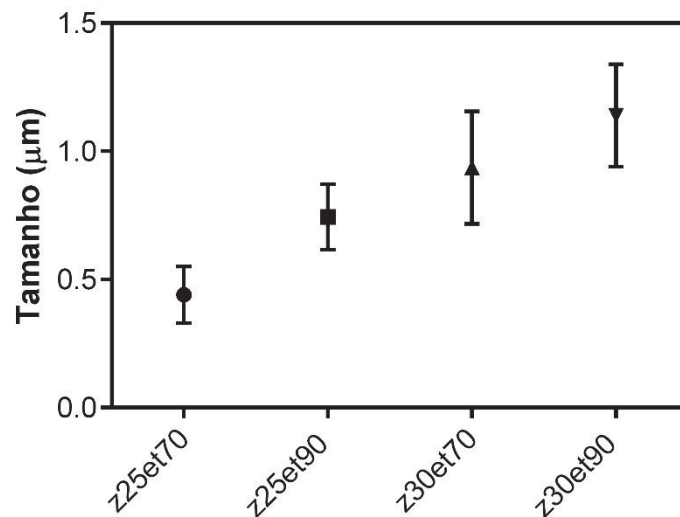


Figura 24 Diâmetro das fibras de zeína eletrofiadas nas concentrações de zeína 25 e 30% e em 70 e 90% de etanol.

Os valores representam a média das medidas obtidas de 30 fibras e as barras representam o desvio padrão.

Como poderá ser visto mais adiante nesse trabalho, o ensaio de MTT apontou para que fossem escolhidas as fibras feitas com zeína a 30% para a incorporação de própolis. Para isso, também se optou pelo solvente etanol 90% que é melhor para a solubilização da própolis. As fibras obtidas bem como a distribuição de tamanho calculada a partir das imagens de MEV podem ser vistas na Figura 25.

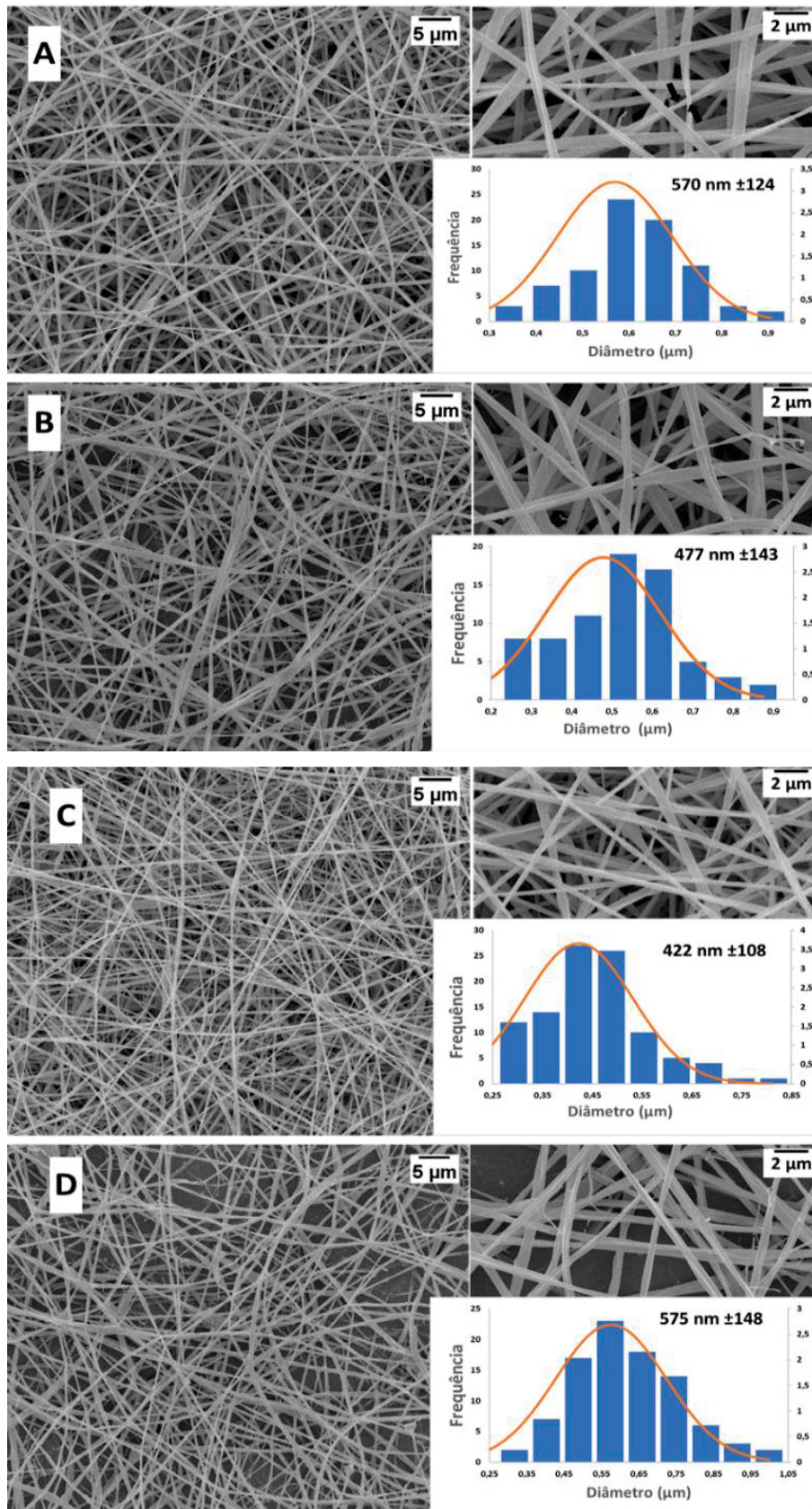


Figura 25 Microscopia eletrônica de varredura e distribuição de tamanho do diâmetro das fibras após o *annealing* a 160°C por 4 h.

A. z30, B. z30p5, C. z30p15 e D. z30p25 em amplificação de 1000x e 5000x. O gráfico demonstra a distribuição do diâmetro das fibras

Para que fosse possível colocar as fibras em contato com o meio de cultura e realizar os testes de biocompatibilidade, foi necessário garantir que as fibras não intumescessem e que elas não se desfizessem. Isso porque biomateriais feitos de proteínas, polissacarídeos e biopolímeros possuem grandes vantagens em termos de biocompatibilidade, porém, usualmente, resultam em materiais instáveis em meio aquoso. Materiais feitos de proteína, como o colágeno e a zeína por exemplo, tendem a desintegrar em ambientes muito úmidos ou em soluções aquosas (CAMPIGLIO *et al.*, 2020). Para melhorar a estabilidade mecânica de biomateriais utiliza-se a reticulação. Esse processo interconecta as cadeias poliméricas presentes na estrutura do biomaterial e aumenta significativamente sua estabilidade (REDDY; REDDY; JIANG, 2015).

Uma das grandes desvantagens da reticulação é o uso, em sua maioria, de reagentes tóxicos, como o glutaraldeído, o que exige etapas de lavagem que tornam o processo mais extenso e não dão garantias de não-toxicidade. Alguns reticulantes como o ácido cítrico, também já vem sendo utilizados para proteínas como colágeno e zeína (REDDY; REDDY; JIANG, 2015).

No presente trabalho, para melhorar a estabilidade mecânica das fibras de zeína, em meio aquoso, sem a necessidade de agentes reticulantes, foi utilizada a metodologia de *annealing*. Durante a produção das nanofibras, a rápida evaporação do solvente, faz com que as cadeias poliméricas assumam uma conformação espacial longe do equilíbrio. A técnica de *annealing* utiliza o emprego de uma força externa, nesse caso a temperatura, que induz uma mudança no equilíbrio de forças na superfície do material e promove uma reorganização das cadeias poliméricas que se acomodam numa conformação mais estável (LEE, 2008; ROY; SHARMA, 2015).

Para caracterização das fibras formadas foram utilizadas as técnicas de FTIR-ATR, ângulo de contato e UV-Vis para quantificação da própolis efetivamente incorporada dentro das fibras.

4.3.2.1 Propriedades Espectroscópicas das Fibras por FTIR

Aqui a técnica de FTIR foi utilizado para fazer a identificação das principais bandas características da própolis (Figura 26) a fim de identificar se estas mesmas bandas estariam presentes nas nanofibras feitas de zeína e própolis. Em seguida foi feita uma comparação entre a zeína em pó e as fibras feitas unicamente de zeína (z30), bem como entre a amostra z30 com as outras amostras de fibras contendo própolis.

Para o extrato de própolis uma banda é observada em 3396 cm^{-1} referente aos grupamentos hidroxila (-OH) presente nos terpenos; presença de uma pequena banda em 3079 cm^{-1} referente ao estiramento de =C-H; bandas pronunciadas são vistas em 2918 cm^{-1} e 2849 cm^{-1}

cm^{-1} que são devido ao estiramento assimétrico e simétrico de grupos CH_2 respectivamente; uma banda em 1691 cm^{-1} é devida ao estiramento de $\text{C}=\text{O}$ presente em grupos funcionais de terpenos; e na região de 1400 cm^{-1} ocorrem bandas atribuídas ao estiramento de ligações $\text{C}=\text{C}$ de anéis aromáticos e finalmente, em 1171 está presente uma banda referente a vibração de $\text{C}-\text{O}$ e $\text{C}-\text{OH}$ (ELBAZ *et al.*, 2016; PAVIA *et al.*, 2012; RAZAVIZADEH; NIAZMAND, 2020; VILLALOBOS *et al.*, 2017).

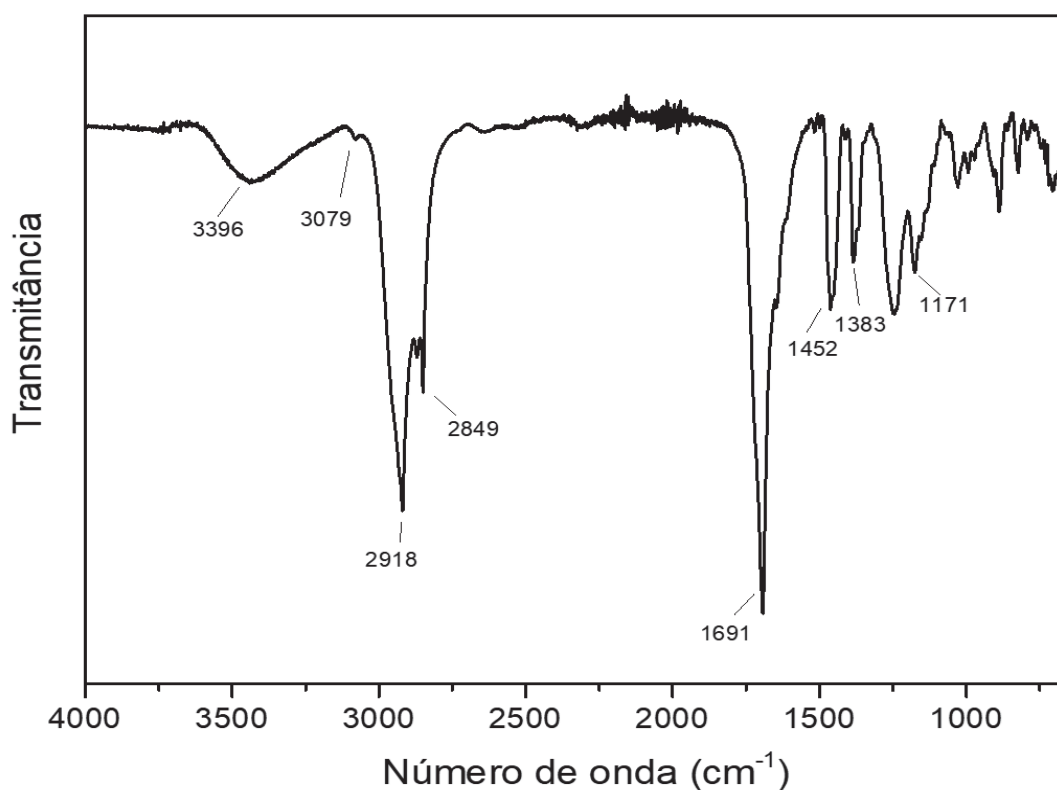


Figura 26 Espectro de infravermelho da própolis obtido por FTIR-ATR.

No espectro da zeína em pó, pode-se notar uma banda alargada na região de 3300 cm^{-1} referente ao estiramento $\text{N}-\text{H}$ e às ligações $\text{O}-\text{H}$ dos aminoácidos. Além disso, bandas características de ligações peptídicas de proteínas aparecem em torno de 1645 , 1529 e 1235 cm^{-1} . Estas regiões são atribuídas, respectivamente, ao dobramento $\text{N}-\text{H}$ de amina primária, mas principalmente ao estiramento $\text{C}=\text{O}$; dobramento $\text{N}-\text{H}$ de amina secundária; e estiramento $\text{C}-\text{N}$ (ALTAN; ÇAYIR, 2020; HEYDARI-MAJD *et al.*, 2019; KARIM; FATHI; SOLEIMANIAN-ZAD, 2020).

Entre o espectro da zeína na forma de pó e o espectro das fibras, há apenas uma diferença representada pelo aparecimento de uma banda em 953 cm^{-1} para a amostra z30 e demais fibras acrescidas de própolis (z30p5-z30p25). Essa banda possivelmente ocorre pela formação de uma nova ligação entre as cadeias de zeína no momento da fiação

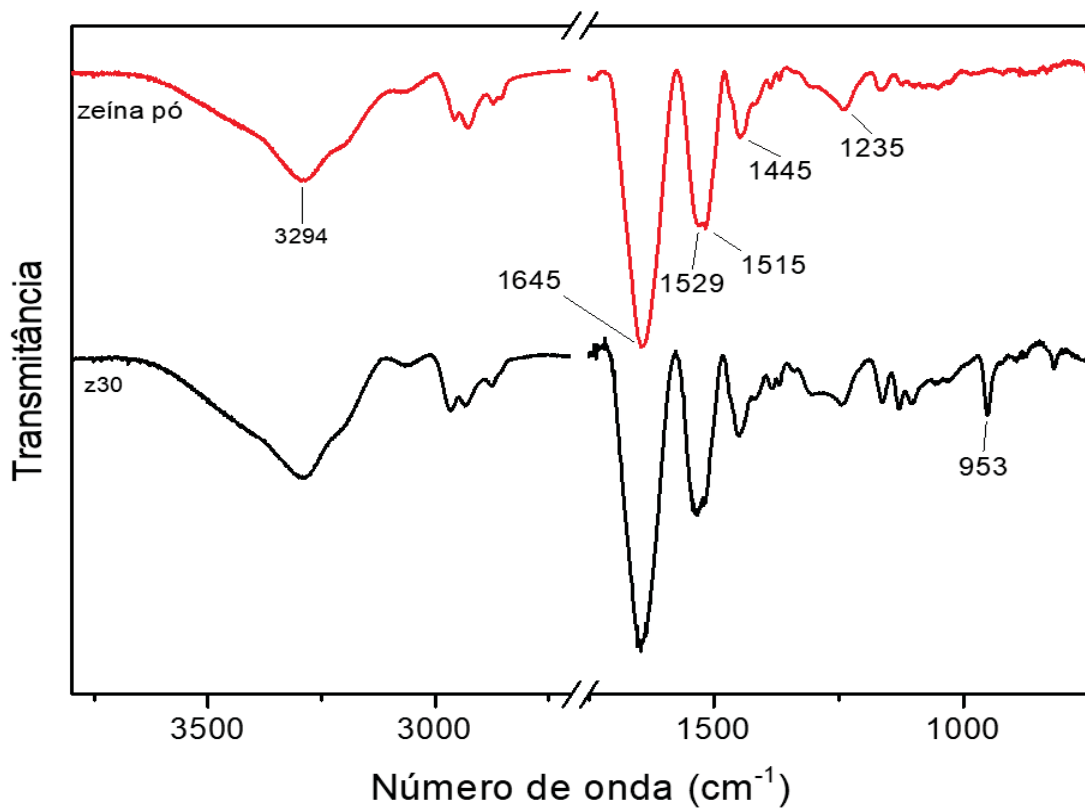


Figura 27 Espectro de FTIR da zeína em pó e das nanofibras obtidas somente com zeína (z30)

Nas amostras de fibras acrescidas de própolis (Figura 28), esperava-se encontrar algumas bandas características da própolis, contudo esse resultado não se concretizou. Comparando-se os espectros da amostra z30 com as fibras contendo própolis, apenas foi possível perceber leves deslocamentos das bandas. Resultados semelhantes já foram encontrados por outros autores e uma razão para isso é que a região de *fingerprint* da própolis, fica encoberta pela zeína que está numa concentração muito maior, sendo difícil distinguir tais sinais nas amostras de fibras com própolis (HEYDARI-MAJD *et al.*, 2019; RAZAVIZADEH; NIAZMAND, 2020).

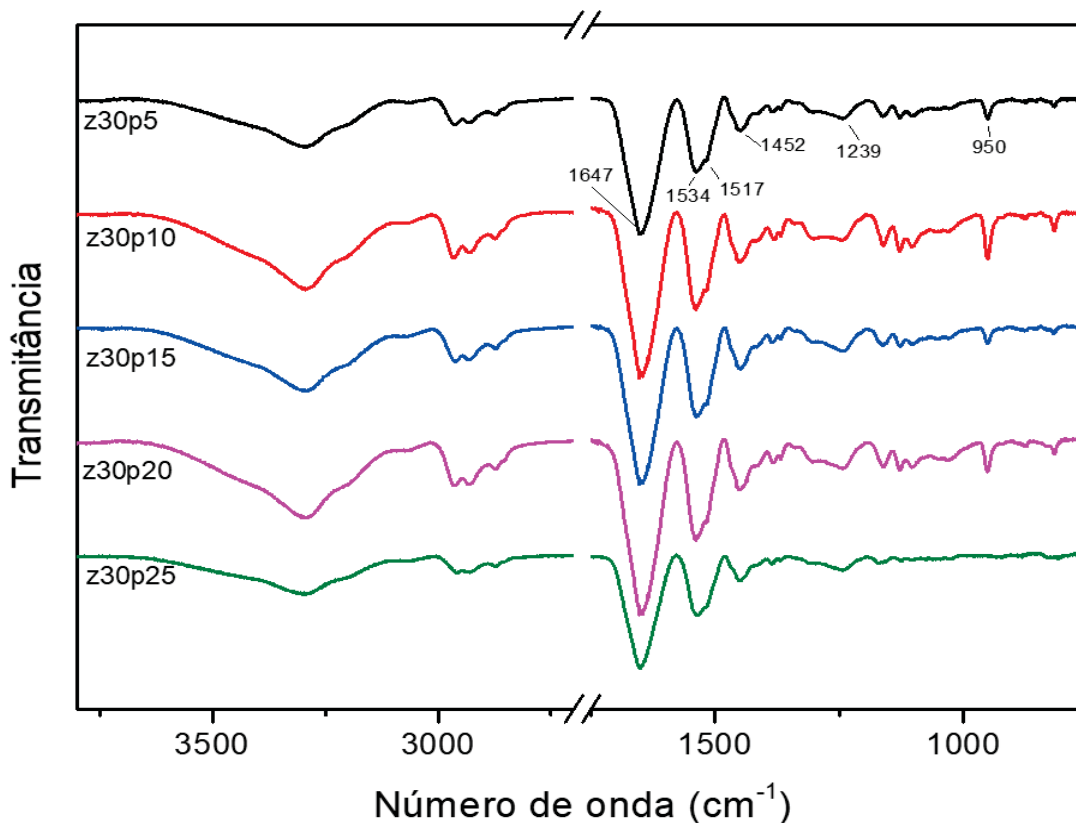


Figura 28 Espectro de FTIR com as nanofibras de zeína acrescidas de própolis (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20, z30p25)

4.3.2.2 Ângulo de Contato entre as Fibras de Zeína e Água

A molhabilidade da superfície tem um papel importante em muitos processos biológicos, químicos e físicos. Em muitos processos industriais tanto a tensão superficial do líquido quanto as propriedades do sólido devem ser otimizadas para garantir a adesão adequada do líquido ao sólido. Tal propriedade é comumente caracterizada pelo ângulo de contato, que é definido como o ângulo entre a tangente à interface líquido-vapor e a superfície sólida na linha de contato trifásica que, por convenção, é medido do lado do líquido (HUHTAMÄKI *et al.*, 2018). As medidas de ângulo de contato podem, também, fornecer de modo indireto, valores de energia livre de superfície que podem levar à informações sobre a polaridade de superfícies (LUZ; RIBEIRO; PANDOLFELLI, 2008).

Enquanto a tensão superficial é um valor quantitativo que é definido nas interfaces formadas por duas fases diferentes, o ângulo de contato (θ) é um ângulo na junção de três fases diferentes. Por convenção, medido no líquido, normalmente no ponto de encontro de gás - líquido - sólido. O molhamento é definido com base na imagem do ângulo de contato. No caso de líquido em uma superfície sólida, o molhamento completo significa que seu ângulo de contato naquela superfície é zero. O não molhamento dá uma forma perfeitamente esférica à gota (Figura 29). No caso da água, quando a superfície apresenta

tendência à molhabilidade total, é geralmente chamada de superfície hidrofílica. A superfície com tendência ao não molhamento é chamada de hidrofóbica. No caso em que o ângulo de contato com a água está acima de 150° , o nome superfície super-hidrofóbica é usado (GOODWIN, 2004; LEE, 2008; SHAW, 1992).

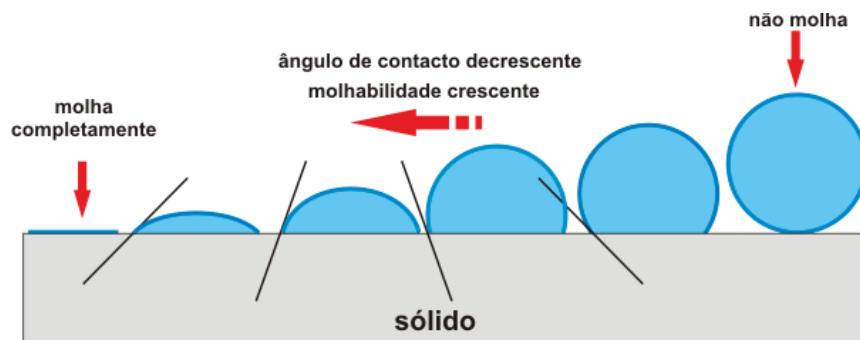


Figura 29 Representação esquemática da molhabilidade de um líquido sobre uma superfície sólida.

Fonte: (ALHANATI, 2021)

Com o objetivo de determinar o caráter hidrofílico ou hidrofóbico das fibras, foram medidos os ângulos de contato formados entre a água ultrapura e a superfície formada pelas fibras antes e depois do *annealing*. O principal objetivo do tratamento térmico foi estabilizar as fibras para que seja possível colocá-las em contato com o meio de cultura. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela 4 e Figura 30.

Foi possível observar que, sem o *annealing*, a gota de água espalha quase que totalmente sobre as fibras, indicado pelos ângulos de contato menores do que 30° para todas as amostras. Para o tratamento térmico de 2 h a 140°C foi possível observar para a amostra z30, os ângulos formados foram maiores que 90° , indicando que a superfície se tornou hidrofóbica. À medida que a concentração de própolis foi aumentada, os ângulos tornam-se menores. Esse fato chama a atenção, pois mesmo a própolis sendo hidrofóbica, a superfície tornou-se mais hidrofílica, quando da sua adição. Isso é um indicativo de que a própolis interage com os domínios hidrofóbicos da zeína, deixando na superfície das fibras resíduos de aminoácidos que possuem maior afinidade com a água. Para o *annealing* de 4 h a 160°C pode-se observar que todos os ângulos ficam maiores que 90° , indicando que a superfície se tornou hidrofóbica.

Tabela 4. Ângulos de contato a direito (D) e a esquerda (E) formados entre a água ultrapura e as fibras feitas com zeína 30%(z30) e zeína com própolis em diferentes proporções de 5 a 25% (z30p5, z30p10, z30p15, z30p20 e z30p25) em etanol 90 (v/v) a 25°C antes e depois do *annealing* feito em diferentes condições

	z30		z30p5		z30p10		z30p15		z30p20		z30p25	
Ângulos (graus)	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
Sem annealing	26	27	19	19	19	22	21	26	19	20	24	26
2 h 140°C	115	119	105	101	79	80	88	91	46	48	47	50
4 h 160°C	114	118	116	124	118	122	117	120	116	118	113	116

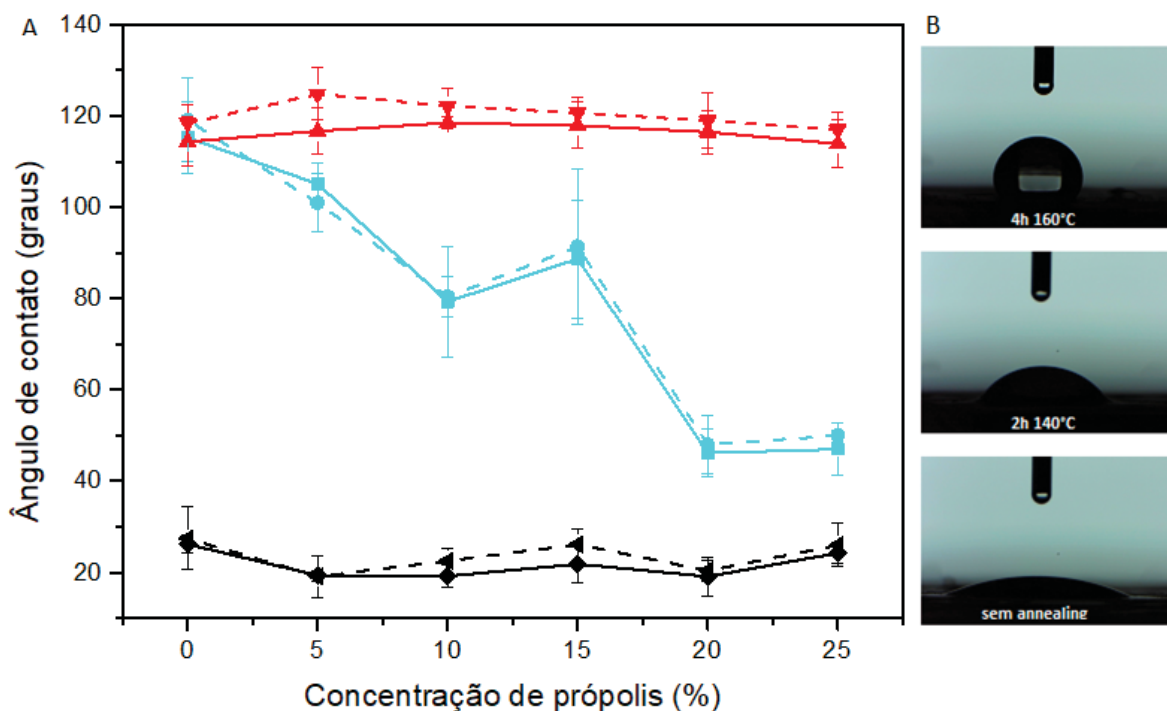


Figura 30 Ângulo de contato formado entre a água ultrapura e as fibras.

A: Ângulos de contato direito (linhas contínuas) e esquerdo (linhas pontilhadas) formados entre a água ultrapura e as fibras só com zeína a 30% e zeína a 30% com diferentes concentrações de própolis (5 a 25%) sem *annealing* (linhas pretas), com *annealing* de 2h a 140°C (linhas azuis) e de 4h a 160°C (linhas vermelhas) e imagens representativas da gota sobre as fibras nas diferentes condições testadas.

Os dados obtidos com esse teste são muito interessantes pois se pode notar que o tratamento térmico impactou significativamente a superfície formada pelas fibras. Segundo CHEN *et al.*, (2014), o *annealing* deve ser feito acima da T_g do polímero, pois nessa temperatura as cadeias poliméricas recuperam a sua mobilidade e podem adotar conformações mais próximas ao equilíbrio. Os resultados da Figura 30 mostram que o tratamento térmico permitiu a mobilidade das cadeias de modo a expor os grupos mais hidrofóbicos para a superfície das fibras, demonstrado pelo maior ângulo de contato com a água. A superfície hidrofóbica é ideal para estudos das fibras em meio de cultura, pois

há a garantia de que as fibras não irão de desintegrar em contato com a água, proporcionando assim, maior estabilidade ao material.

4.3.2.3 Comportamento Térmico das Nanofibras

O DSC pode dar informações importantes sobre a estrutura do material, como possíveis interações entre o polímero e o material a ser encapsulado, através do desaparecimento ou deslocamento dos picos de fusão, cristalização ou outros eventos térmicos (AMJADI *et al.*, 2020; DA ROSA *et al.*, 2020).

Os resultados podem ser vistos na Figura 31 e na Tabela 5. Para a zeína pura foi detectado um evento endotérmico por volta de 130°C que corresponde à sua T_g e um pronunciado evento endotérmico que iniciou em 171°C e teve seu máximo em 175°C que corresponde à fusão da zeína, esses resultados estão de acordo com estudos prévios realizado por (GHANBARZADEH *et al.*, 2006; MADEKA; KOKINI, 1996). Para a própolis pura o primeiro evento endotérmico ocorre em 46°C, seguido de um segundo evento endotérmico que inicia por volta de 155°C e outro evento pronunciado ocorre por volta de 255°C, que marcam respectivamente, a volatilização dos monoterpenos; volatilização de terpenos de maior massa e triterpenos constitutivos da própolis; e sua completa degradação pelo calor. Para as nanofibras feitas somente com zeína, ocorre a diminuição da T_g para temperatura em torno de 110°C.

Para as nanofibras contendo própolis, o pico que ocorre em 46°C, desaparece, e então pode-se afirmar que houve uma completa miscibilidade entre a zeína e a própolis nas dispersões precursoras das nanofibras e isso evitou a volatilização dos terpenos. Se isso não fosse verdadeiro, dois picos endotérmicos apareceriam, demonstrando a imiscibilidade do material (DA ROSA *et al.*, 2020; GHANBARZADEH *et al.*, 2006). Esse fenômeno pode ser notado na amostra z30p25 em que ocorre um evento endotérmico em torno de 86°C, provavelmente, devido a um excesso de própolis que não foi completamente incorporado às fibras. Para as amostras z30p5 a z30p20, em torno de 87°C, ocorre um deslocamento da linha de base que pode ser interpretado como um evento térmico de segunda ordem, que corresponde a T_g das fibras de zeína, que diminuiu em relação à zeína em pó. Uma vez que a T_g depende da mobilidade e da miscibilidade das cadeias dos polímeros (GHANBARZADEH *et al.*, 2006), pode-se dizer que a própolis atuou como um plastificante nesse sistema, e isso foi evidenciado pela diminuição da T_g.

Na temperatura de 168°C ocorre um evento endotérmico que corresponde à fusão do polímero, implicando na ruptura de ligações de hidrogênio, ligações de dissulfeto, interações hidrofóbicas (DA ROSA *et al.*, 2020). Após 250°C, todas as amostras passam por outro evento endotérmico que marca a degradação compatível com a desnaturação proteica da zeína (ALTAN; ÇAYIR, 2020).

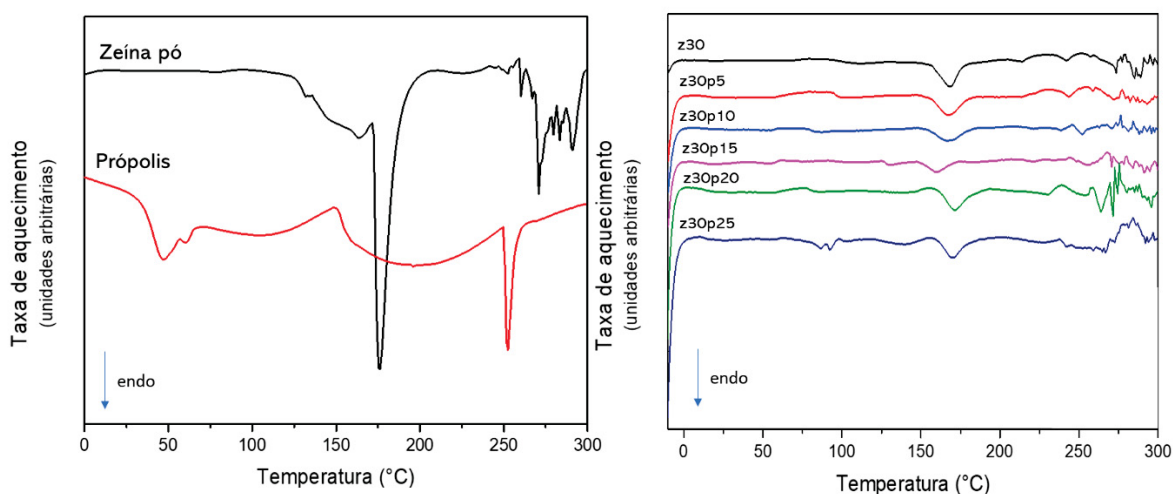


Figura 31 Calorimetria exploratória Diferencial (DSC)
 A. zeína em pó e própolis e B. fibras feitas apenas de zeína (z30) e zeína e própolis (z30p5 a z30p25)

Ao calcular-se a variação de entalpia (dH) do pico referente à fusão das amostras, pode-se perceber que ocorre aumento do dH quando se compara a zeína em pó e as fibras feitas somente com zeína. Além disso, para as fibras acrescidas de própolis o aumento da entalpia mostra-se bastante pronunciado, indicando que, mais energia é necessária para fundir a amostra. Para amostra z30p25 há um indicativo de que a proporção entre zeína e própolis seja desfavorável ao material, podendo ser pelo excesso de própolis. Na curva de DSC pode ser visto, para esta amostra, picos em 87°C e 93°C similares aos encontrados na curva de DSC da própolis pura, isso pode indicar que a própolis ocupou todos os sítios da zeína e que seu excesso volatiliza da superfície da fibra.

Tabela 5. Variação de entalpia de fusão nas amostras submetidas ao DSC

Amostra	Massa (g)	Área do pico	dH (kJ/g)
Zeína pó	0,0088	176,34	20,03
z30	0,0061	167,78	27,50
z30p5	0,0038	166,81	43,90
z30p10	0,0038	166,81	43,90
z30p15	0,0037	160,02	43,25
z30p20	0,0034	171,66	50,50
z30p25	0,0041	170,69	41,63

Assim, com esta técnica se pôde observar pelo menos três fenômenos: primeiro, a zeína quando na forma de nanofibras, tem seu comportamento térmico alterado em relação à zeína em pó; segundo, a própolis, quando inserida nas nanofibras, muda seu perfil de degradação, confirmando, mais uma vez, a sua forte interação com a zeína; terceiro, a

própolis causa um aumento da mobilidade entre as cadeias poliméricas, o que é evidenciado pela diminuição da T_g das amostras contendo própolis em relação à zeína em pó e à amostra z30.

Já foi relatado por outros autores, que a adição de óleos essenciais e plastificantes às nanofibras e filmes de zeína são capazes de formar ligação de hidrogênio entre as cadeias poliméricas, causando uma maior organização e compactação das fibras, que acabam por, diminuir a T_g, bem como aumentar a estabilidade térmica do material, evidenciado por temperaturas maiores de degradação do material (ALTAN; ÇAYIR, 2020; AMJADI *et al.*, 2020; DA ROSA *et al.*, 2020). Como se sabe, os materiais à base de zeína possuem rigidez a fragilidade, com isso, a inserção de moléculas que possam exercer dupla função – melhorar as suas propriedades mecânicas e adicionar propriedades terapêuticas ao material – mostram-se bastante promissoras. Pode-se dizer então, que a própolis, pelo seu caráter apolar, desempenhou com sucesso essa função nas fibras de zeína.

4.3.2.4 Quantificação da Própolis Incorporada nas Fibras

Para quantificação da própolis incorporada nas fibras feitas com zeína a 30%, fez-se a extração com diclorometano de uma quantidade de fibras depositadas durante 20 minutos sobre uma lamínula de vidro de 2 cm x 2 cm para cada uma das amostras. Os valores de absorvância obtidos foram transformados em concentração através da curva analítica ($y = 0,3424 + 9,21633x$, $R^2 = 0,9991$).

Os pontos obtidos entre as concentrações de própolis extraídas das fibras variaram bastante entre as replicatas (evidenciado pela barra de desvio padrão) da Figura 32, isso pode ser reflexo da falta de homogeneidade da deposição das fibras sobre a lamínula, pois através da técnica de *electrospinning* não se pode controlar a quantidade exata de fibras depositadas em cada lamínula. Essa medida foi feita antes e depois do *annealing* para garantir que a própolis não está volatilizando da fibra durante o tempo de estufa. Para as amostras z30p5, z30p10 e z30p15 a quantidade de própolis extraída da fibra antes e depois do *annealing* não foi considerada estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney feita pelo software GraphPad Prism®. Para as amostras z30p20 e z30p25, pode-se observar que a diferença de própolis presente antes e após o *annealing*, apresenta uma maior variação em relação as demais amostras (z30p5, z30p10 e z30p15) que também não foi considerada estatisticamente significativa pelo teste de Mann-Whitney.

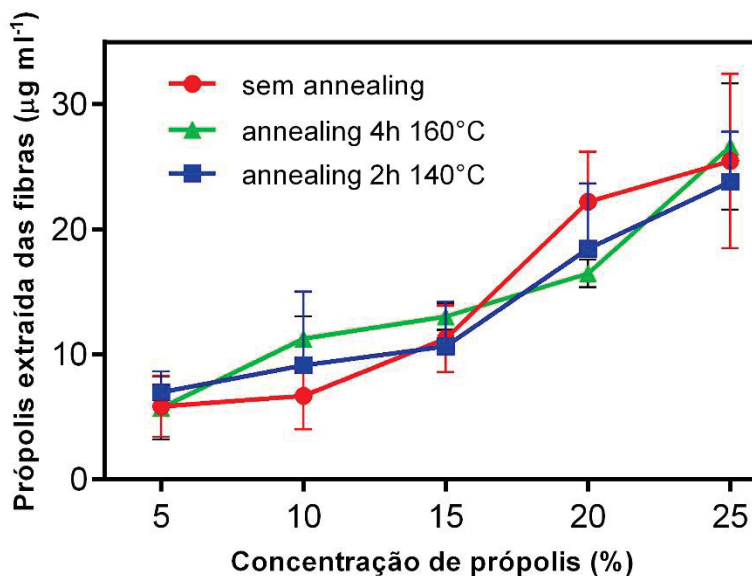


Figura 32 Concentração de própolis extraída das fibras de antes e depois do *annealing* feito em 2h a 140°C e 4h a 160°C em função da concentração de própolis (5 a 25%) adicionada a dispersão de partida para eletrofição. Os pontos representam a médias das triplicatas com as barras de desvio padrão.

A partir do conhecimento da média de concentração de própolis incorporada/extraída das fibras depositadas no tempo de 20 minutos na área da lamínula quadrada (área = 4 cm²), pode-se fazer a proporção para a área da lamínula redonda (área = 1,32 cm²) que é utilizada nos ensaios de cultivo celular. Os resultados, em microgramas por centímetro quadrado, estão expressos na Tabela 6.

Conhecer esses resultados é importante pois assim tem-se conhecimento da quantidade de própolis que pode ser liberada para as células nos ensaios biológicos e assim, correlacionar com os efeitos vistos nas células.

Tabela 6. Quantidade de própolis incorporada/extraída das fibras depositadas em lamínulas de área de 4 cm² e a proporção calculada para a deposição numa lamínula redonda de 1,32 cm². Os resultados estão expressos em µg por cm².

		z30p5	z30p10	z30p15	z30p20	z30p25
140°C 2h	4 cm ²	20,93	27,36	31,89	55,32	71,40
	1,32 cm ²	6,90	9,02	10,52	18,25	23,56
160°C 4h	4 cm ²	17,163	36,75	39,09	49,41	79,83
	1,32 cm ²	5,66	12,12	12,90	16,30	26,34

4.3.2.5 Estudo de Biocompatibilidade/Citotoxicidade das Fibras

Um dos esforços contínuos na engenharia de tecidos é a criação de um arcabouço que imite perfeitamente as características de uma matriz extracelular (MEC) para o cultivo

de células (ZIAEI AMIRI *et al.*, 2020). Na engenharia de tecidos da pele, as nanofibras eletrofiadas são particularmente atraentes devido à sua morfologia e sua arquitetura biomimética semelhante às fibras proteicas presentes na matriz extracelular. Isso permite que as nanofibras eletrofiadas promovam uma reepitelização aprimorada e a formação de neotecidos de feridas. Os avanços nos estudos com o uso de equipamentos de *electrospinning* e a funcionalização das fibras com diversos tipos de ativos, permitem ainda a administração transdérmica de fármacos como no tratamento de melanoma, por exemplo (CAVO *et al.*, 2020; KEIROUZ *et al.*, 2020)

Com a finalidade de avaliar a biocompatibilidade das fibras de zeína pura, foi realizado o ensaio de MTT utilizando as amostras z25et70, z25et90, z30et70 e z30et90. Esses ensaios, juntamente com a análise morfológica das fibras daria direcionamento para a escolha da melhor condição de eletrofiação (item 4.3.2).

O MTT, um sal tetrazólico, é capturado pelas células e então é reduzido pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis para formar como produto o azul de formazan que pode então ser detectado em espectrofotômetro com absorção máxima em 570 nm (Figura 33). O ensaio mede a atividade mitocondrial, que é proporcional à quantidade de formazan produzida refletindo assim, a integridade do metabolismo celular (FRANCHI *et al.*, 2012). Os resultados obtidos no teste de MTT podem ser vistos na Figura 34.

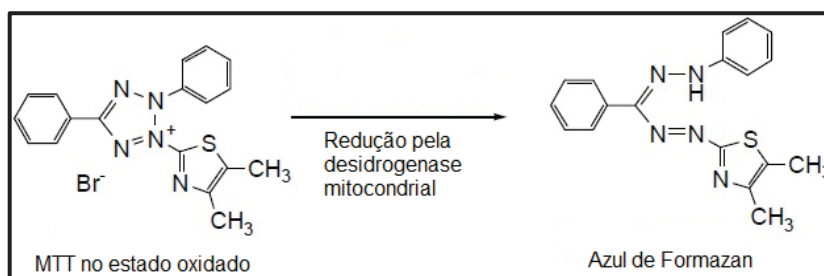


Figura 33 Esquema de redução do MTT para o Azul de formazan

O resultado desse ensaio pode ser visto na Figura 34. Pode-se perceber que nenhuma das fibras teve a capacidade de danificar as células e, apesar de o software não ter calculado diferença significativa entre a viabilidade celular nas células Balb/3T3, é possível observar no gráfico para a concentração de zeína a 30% as células tiveram uma maior conversão de MTT. Isso serviu como indício de uma maior afinidade das células com esse tipo de fibra, por isso, as fibras feitas com zeína 30% foram escolhidas para a continuidade da eletrofiação, a partir de então, com a própolis sendo inserida nas fibras.

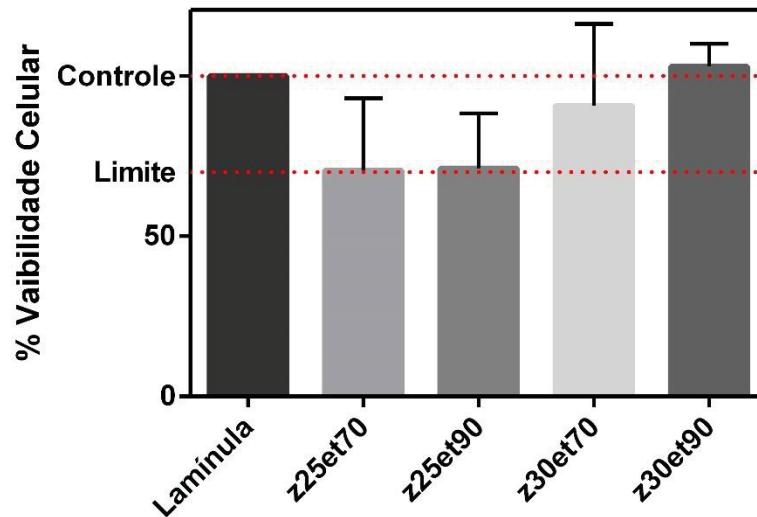


Figura 34 Ensaio de MTT com células Balb/3T3 sobre as fibras feitas com zeína pura. Viabilidade Celular das células Balb/3T3 frente as fibras de zeína 25% em etanol 70% (z25et70) e 90% (z25et90) e fibras de zeína 30% em etanol 70 (z30et70) e 90% (z30et90).

O crescimento celular foi observado por microscopia óptica em microscópio invertido e as imagens representativas das células com sua morfologia característica são apresentadas na Figura 35. Pelas imagens de microscopia foi possível observar a morfologia preservada das células e que as fibras estavam servindo de arcabouço para a ancoragem celular, uma vez que as células passaram a crescer e espalhar-se sempre no sentido das fibras, e não mais em sentido randômico como ocorre em superfície lisas.

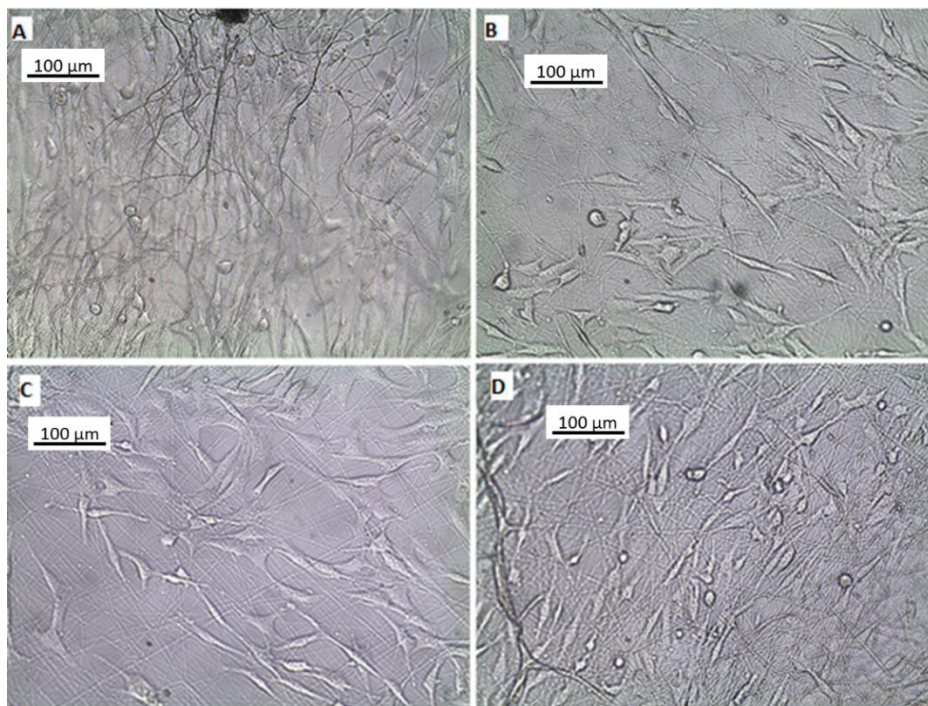


Figura 35 Imagens de microscopia óptica das Células Balb/3T3 cultivas sobre as fibras A: zeína 25% em etanol 70%, B: zeína 30% em etanol 70%, C: zeína 25% em etanol 90% e D: zeína 30% em etanol 90%

Prosseguiu-se com a análise das fibras contendo própolis de maneira a verificar se eram biocompatíveis com as células da derme (Balb/3T3) ou se apresentavam atividade citotóxica (antitumoral) frente às células de melanoma (B16-F10) e para isso foram realizados os ensaios de MTT e vermelho neutro.

Os resultados dos ensaios de MTT e VN das células Balb/3T3 podem ser vistos na Figura 36. Dentre as amostras com própolis, pode-se perceber um aumento significativo da conversão do MTT em formazan para as células cultivadas sobre as fibras z30p15 quando comparadas à amostra z30. Para as amostras subsequentes, z30p20 e z30p25, em relação a z30p15, pode-se perceber um declínio não significativo na absorvância. Visualmente, não foi detectado nenhuma alteração morfológica que representasse danos às células.

O aumento da conversão de MTT poderia ser liderado ou por um aumento da proliferação de células ou por uma interferência na conversão de formazan através do tratamento. Já está bem estabelecido que a própolis em geral, devido às suas propriedades antioxidantes, desempenha um papel importante na proteção mitocondrial contra o stress oxidativo (ANVARIFARD *et al.*, 2022; BHARGAVA *et al.*, 2021; KUBILIENE *et al.*, 2018) e, como antioxidante, pode interferir com o ensaio de MTT (BRUGGISSER *et al.*, 2002; SOMAYAJI; SHASTRY, 2021). Uma vez que o vermelho neutro não sofre interferência do tratamento, foi possível determinar através desse ensaio que não estava ocorrendo aumento da proliferação celular e nem mesmo danos as células até a concentração de 20%. Para a amostra z30p25 o ensaio de VN mostrou diferença significativa em relação ao controle (z30). Com base nos resultados obtidos pela própolis incorporada na quantificação das fibras (Figura 32 item 4.3.2.4), esta quantidade de própolis (25%) deveria promover diminuição da viabilidade celular de mais de 50% considerando a própolis IC_{50} em células Balb/3T3. Contudo, é possível notar que a viabilidade se manteve no limite de 70% aceito pela ISO 10993-5/2009 (INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5:2009(E), 2009). Isso sugere que a própolis é liberada de uma forma gradual, ou mesmo, não totalmente liberada para as células.

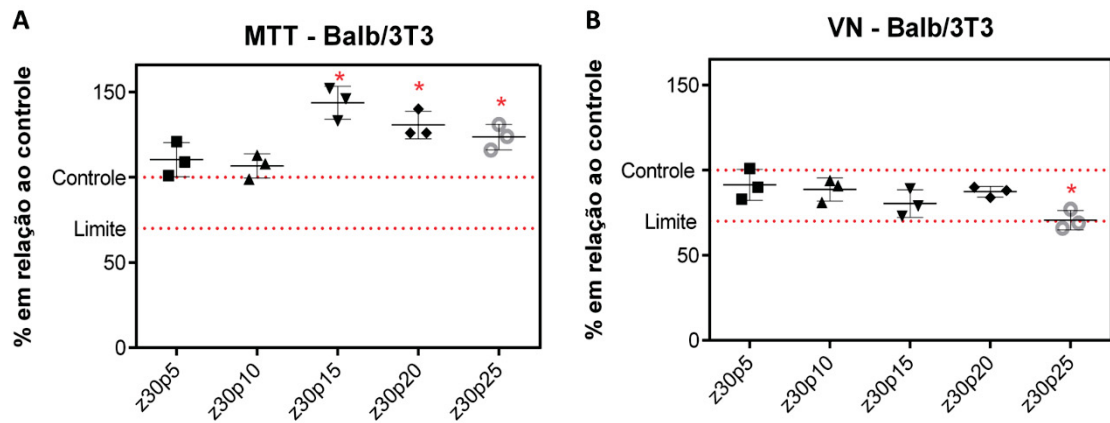


Figura 36 Ensaio de biocompatibilidade das fibras frente as células Balb/3T3 A. ensaio de MTT e B: ensaio de vermelho neutro.

O controle (z30) representa 100% e o Limite representa 70% de viabilidade celular. * representa diferença significativa das amostras contendo própolis e a z30.

O acompanhamento da morfologia celular foi feito por microscopia eletrônica de varredura, em que foi possível observar em detalhes as diferenças morfológicas nas células Balb/3T3 cultivadas sobre as lamínulas (ambiente 2D) e sobre as fibras (ambiente 3D). As imagens podem ser vistas na Figura 37.

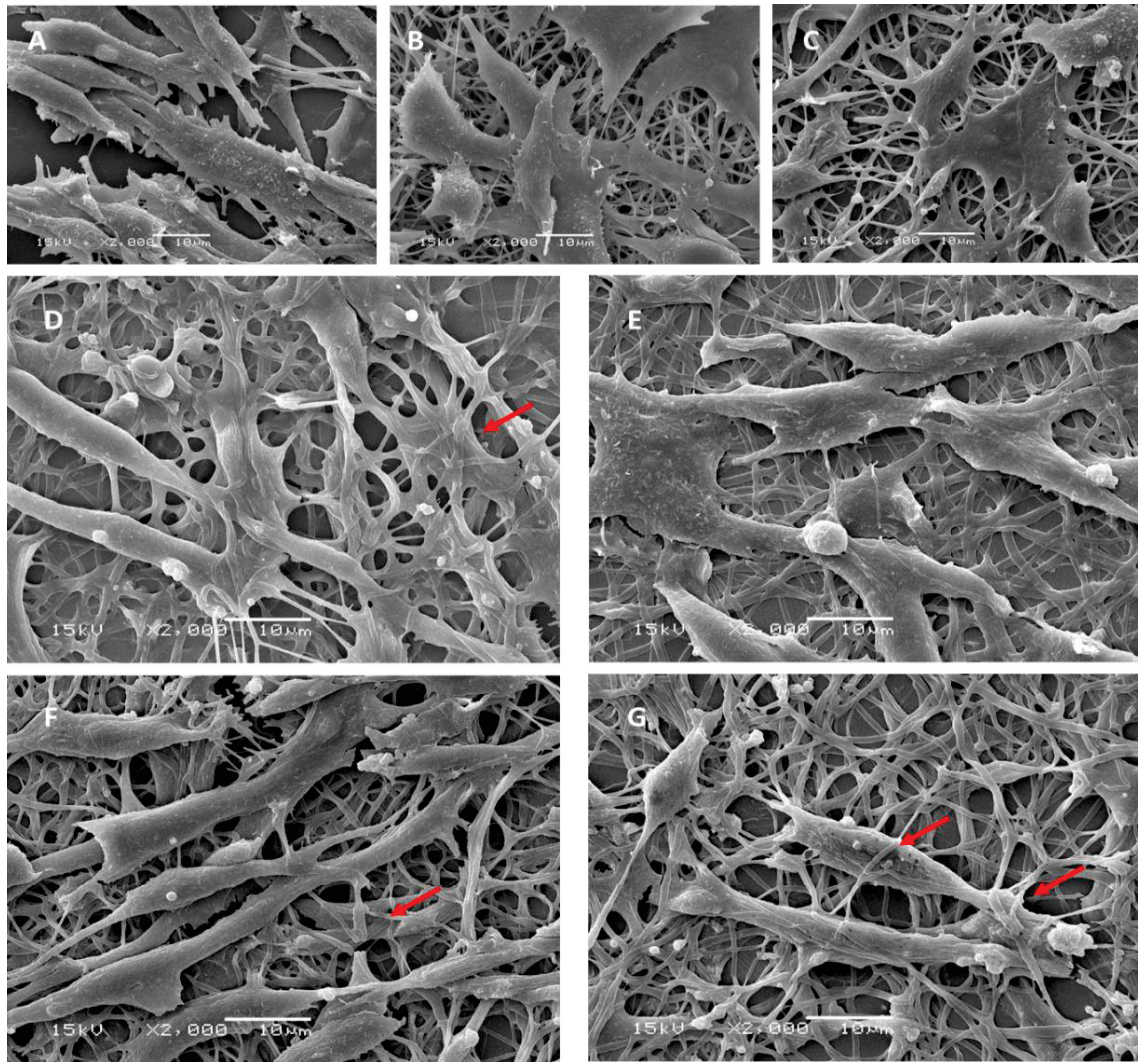


Figura 37 Imagens de MEV para acompanhamento do ensaio de biocompatibilidade das células Balb/3T3 cultivadas sobre A. lamínula, B: fibras de zeína (z30) e zeína com própolis C: z30p5, D: z30p10, E: z30p15, F: z30p20 e G: z30p25. As setas vermelhas destacam as células entrelaçadas com as fibras.

As células cultivadas numa superfície lisa como a lamínula (Figura 37A) estavam espalhadas e apresentavam morfologia alongada característica com projeções típicas dos fibroblastos. A morfologia das células cultivadas na amostra z30 (Figura 37B), sem própolis, apresentaram diferenças leves, as células permaneceram espalhadas e alongadas, mas com mais projeções de membrana, provavelmente devido à topografia irregular gerada pelas fibras.

Na amostra z30p5 (Figura 37C), observou-se que as células se tornaram ligeiramente mais alongadas. É interessante notar que as células começaram a entrelaçar-se com as fibras e a seguir a sua direção de espalhamento. Esse entrelaçamento torna-se mais evidente com o aumento da concentração de própolis. Na amostra z30p25 (Figura 37G) as células parecem ter uma preferência para crescer emaranhadas com fibras. Isso revela a elevada afinidade dos fibroblastos com as fibras carregadas de própolis. O fato de as células crescerem mais entrelaçadas nas fibras z30p25 pode ter impedido a divisão

celular em relação às outras amostras, o que refletiu na diminuição da incorporação do corante VN (PELIPENKO *et al.*, 2013), uma vez que nenhuma célula morta foi detectada por análise morfológica.

Com a análise das imagens, e dos resultados dos ensaios apresentados no item 4.3.1, foi possível sugerir um mecanismo de interação entre as fibras e as células: a zeína em etanol, comporta-se como um polímero intumescido (LI *et al.*, 2012), que deixa expostos grupos funcionais dos seus aminoácidos, possibilitando à própolis interagir com resíduos tais como COOH, OH e NH₂; além disso, interações ácido-base podem ocorrer à medida que mais própolis é adicionada ao sistema e assim, a própolis protona grupos como -NH₂ a -NH₃⁺, o que pode ser visto nos resultados de potencial Zeta da zeína. Como as membranas celulares têm uma carga negativa, pode haver preferência de interação destas por superfícies com carga positiva, como a das fibras, que acabam servindo como um excelente suporte para a adesão das proteínas de membrana. A Figura 38 traz uma imagem ilustrativa da hipótese sugerida, porém, outros mecanismos podem estar contribuindo para este fenômeno.

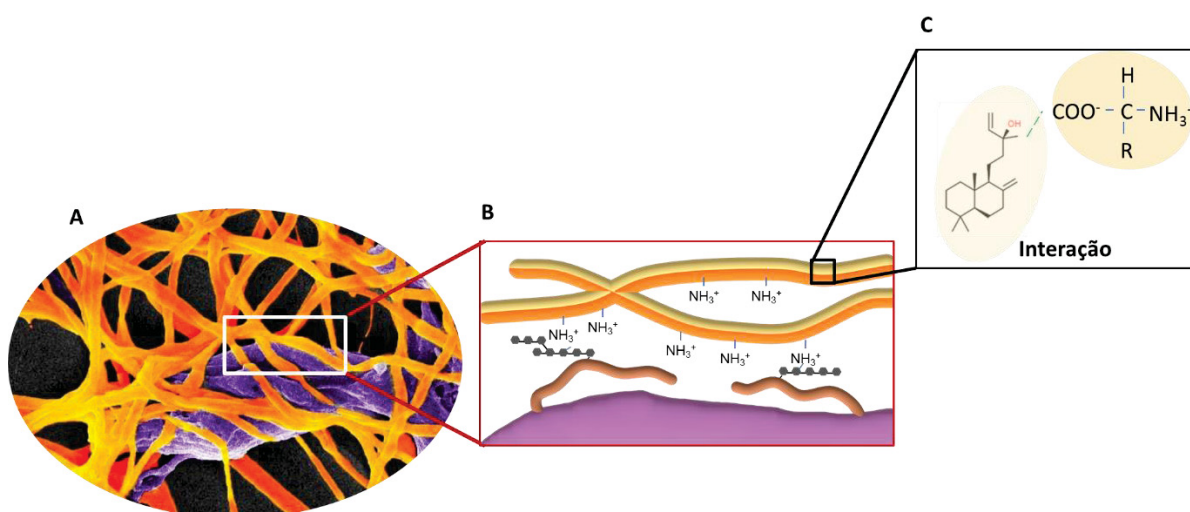


Figura 38 Esquema representativo da interação entre as células e as fibras.

A. Imagem de MEV colorida com auxílio de software demonstrando o entrelaçamento das células nas fibras; B: interação entre as proteínas de membrana das células e os grupos -NH₃⁺ da zeína e C: possível interação entre os terpenos da própolis e os aminoácidos da zeína.

Resultados semelhantes já foram descritos por outros autores (KIM *et al.*, 2012), em que apenas as células cultivadas em superfícies com carga negativa assumiram a conformação alongada e delgada (*spindle-shaped*, ou formato em fuso), enquanto as células cultivadas em superfícies com carga positiva tiveram melhor aderência, espalhamento e crescimento, devido à presença de resíduos de aminoácidos como o NH₃⁺. Também em outros trabalhos realizados por Camargo *et al.* (2021) as células Balb/3T3 crescidas sobre nanofibras PMMA-OH funcionalizadas assumiram forma de fuso muito

pronunciada, mas não se observou qualquer entrelaçamento, evidenciando que as células crescem apenas na superfície das fibras.

Com esses experimentos foi possível demonstrar a biocompatibilidade das fibras de zeína carregadas de própolis em todas as concentrações testadas de própolis. Além disso, foi possível selecionar a concentração adequada de própolis, como sendo 15%, a ser adicionada às fibras em experimentos futuros, uma vez que, concentrações superiores a 15% parecem não trazer qualquer benefício adicional a esta linhagem celular. Em resumo, as próprias fibras de zeína servem como um ambiente matricial favorável ao crescimento das células e a adição de própolis resulta um ambiente que favorece a interação das células com as fibras.

Em seguida realizou-se os mesmos experimentos para as células B16-F10, com o objetivo de avaliar se as fibras teriam a capacidade de interferir em algum parâmetro celular Figura 39. No ensaio de MTT houve um declínio na conversão do MTT em formazan em relação ao controle de uma maneira concentração-dependente. Essa diferença foi considerada estatisticamente significativa para a amostra z30p20 e z30p25 em relação à amostra z30. No ensaio de vermelho neutro (Figura 39B), a diferença foi considerada significativa entre o controle (z30) e as fibras z30p10 até z30p25. Esse resultado também foi acompanhado e confirmado pela análise morfológica feita com a microscopia óptica das células B16-F10 (Figura 40) em que se notou que a partir da concentração de 10%, isto é, z30p10, percebe-se uma menor quantidade de células do que no controle (z30).

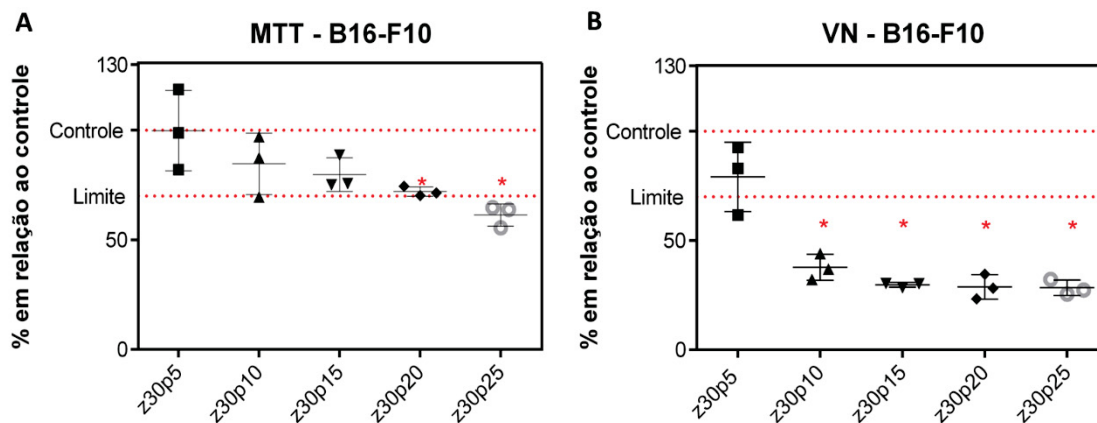


Figura 39 Ensaio de biocompatibilidade das fibras frente as células B16-F10 A. ensaio de MTT e B: ensaio de vermelho neutro.

O controle (z30) representa 100% e o Limite representa 70% de viabilidade celular. * representa diferença significativa das amostras própolis e a z30.

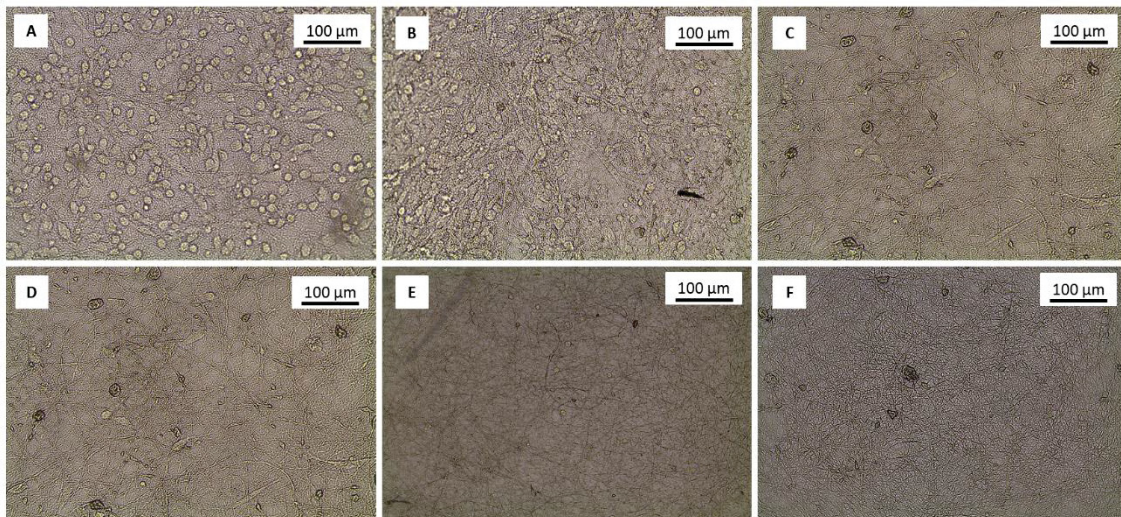


Figura 40 Imagens de microscopia óptica das células B16-F10 cultivadas sobre A: z30, B: z30p5, C: z30p10, D: z30p15, E: z30p20 e F: z30p25

Nas imagens de microscopia eletrônica (Figura 41) é possível ver ainda, com mais detalhes, a morfologia das células. Para as células cultivadas sobre a lamínula sem fibras é possível perceber uma morfologia mais espalhada. Nas células cultivadas sobre a z30 (Figura 41B) pode-se notar o formato um pouco mais alongado, e percebe-se maior crescimento em direções de altura e profundidade e não apenas lateralmente como na lamínula. Nas fibras acrescidas de própolis o que se nota é um aumento de vesículas celulares, e esse aumento é concentração-dependente. A partir de 10% de própolis o aumento das vesículas é bem pronunciado. Isso pode indicar toxicidade para estas células. Nas amostras z30p15, z30p20 e z30p25 é evidente a presença de células em processo de morte celular. São observadas porções celulares em forma de “bolinhas” – no inglês *blebs*, de diversos tamanhos, que indicam apoptose celular (PALUCH; RAZ, 2013). Na amostra z30p25 (Figura 41G) a quantidade de células com morfologia similar ao controle (z30) observada estava bastante diminuída.

Tradicionalmente, a determinação de atividade biológica envolve análises *in vitro* do comportamento celular usando predominantemente culturas de células bidimensionais (2D) e modelos animais *in vivo*. Os modelos 2D são rotineiramente usados como sistemas iniciais para avaliar a eficácia das moléculas como fármacos potenciais para, somente então, avançar para estudos em animais e ensaios clínicos em humanos. As diferenças no comportamento celular entre culturas 2D e tumores reais são bem conhecidas e derivam principalmente de mudanças na expressão gênica originadas das diferentes interações às quais as células são submetidas em um microambiente 2D se comparado ao seu ambiente naturalmente 3D. No entanto, os modelos de cultivo 3D representam melhor as condições *in vivo*, o que ajuda na análise mais precisa da resposta celular. Por todas essas razões, há um interesse crescente no desenvolvimento de novos modelos 3D de cultivo celular *in*

in vitro para serem adotados como pré-triagem de resposta a novos fármacos (CAVO *et al.*, 2020).

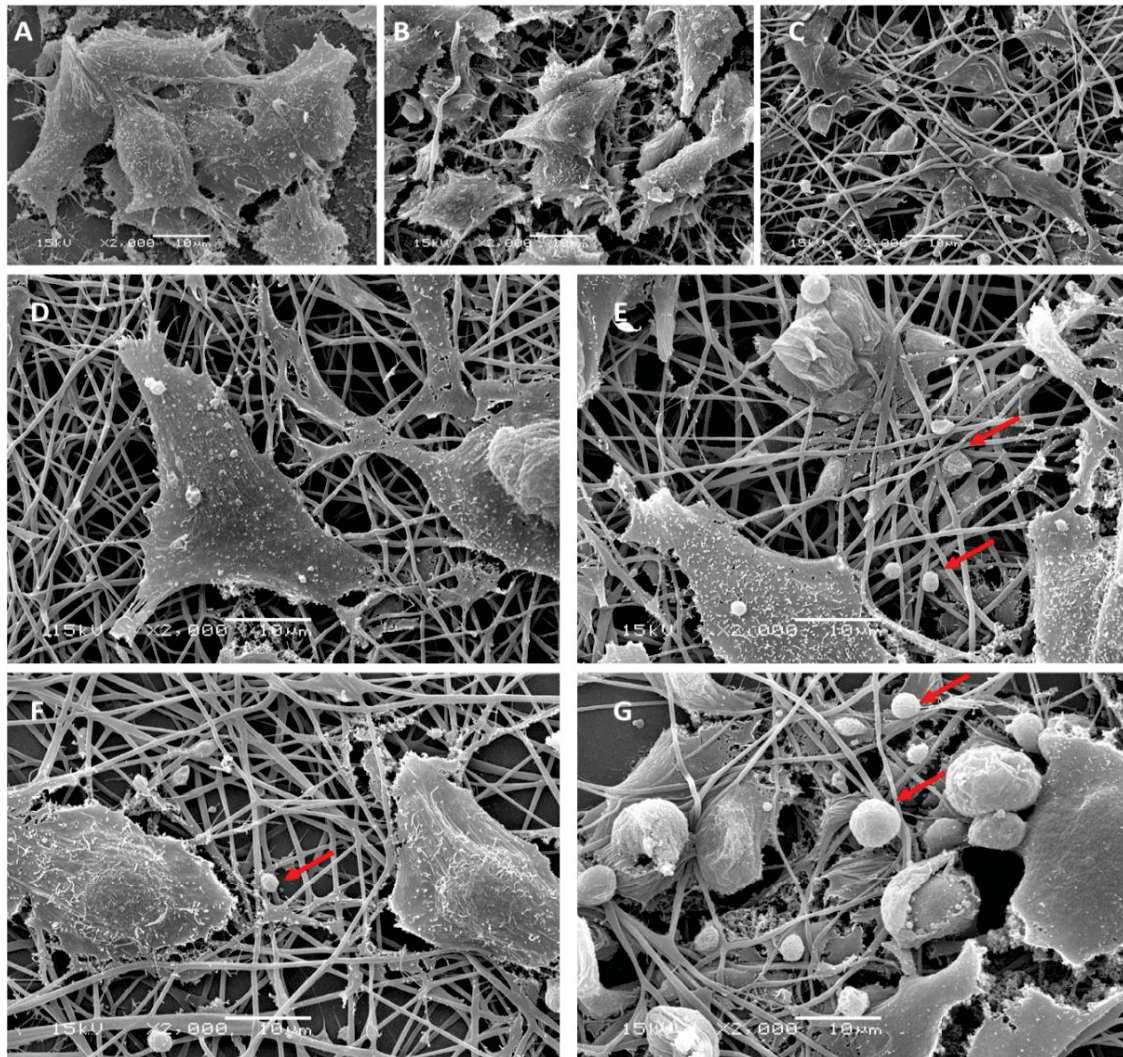


Figura 41 Imagens de MEV das células B16-F10 para acompanhamento do ensaio de citotoxicidade A. lamínula, B: fibras de zeína (z30) e zeína com própolis C: z30p5, D: z30p10, E: z30p15, F: z30p20 e G: z30p25. As setas vermelhas destacam porções vesiculadas ou *blebs*.

Estudos envolvendo a fabricação de nanofibras contendo própolis com posterior investigação da atividade tumoral são raros, a maioria dos estudos comprovam apenas a biocompatibilidade e atividade antimicrobiana do material. BILGINER *et al.*, (2021) fizeram nanofibras de PVA e própolis e sobre elas foram cultivadas as células tumorais HeLa, não foi vista atividade antitumoral e os autores apenas evidenciaram a capacidade das células se aderirem e proliferarem sobre as fibras.

4.4 Nanogel para Encapsulação da Própolis

4.4.1 Caracterização do Alginato de Sódio

Para conhecer os dados de massa molar e a quantidade de blocos G e M que estão presentes no lote utilizado submeteu-se a amostra às análises de HPSEC e RMN. O perfil cromatográfico do alginato de sódio está apresentado na Figura 42, em que é possível observar uma distribuição monomodal eluindo em torno de 40 mL. Os valores da massa molar ponderal média (\bar{M}_w) e numérica (\bar{M}_n), bem como o valor do incremento de índice de refração (dn/dc) obtido previamente encontram-se na Tabela 7.

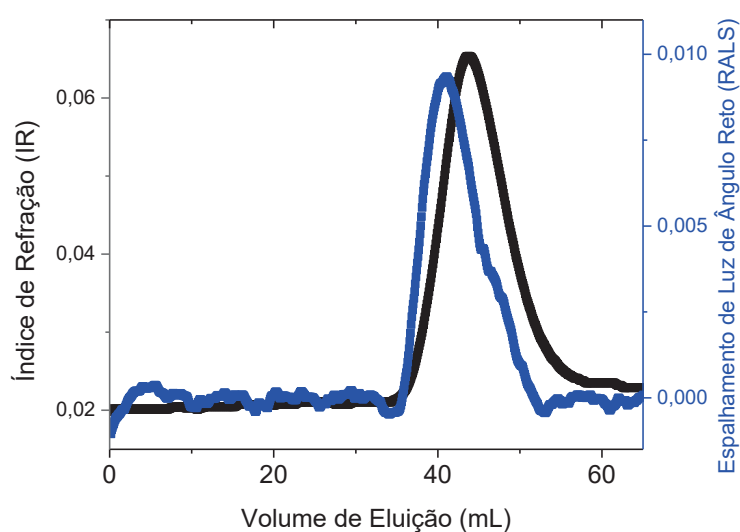


Figura 42 Perfil cromatográfico obtido por HPSEC da amostra de alginato de sódio. IR: Índice de refração; RALS: Espalhamento de luz de ângulo reto. A linha preta representa o perfil obtido com refratômetro e a linha azul representa o perfil obtido pelo detector de espalhamento de luz.

Tabela 7. Incremento de índice de refração (dn/dc), massa molar do alginato de sódio (M_w , M_n) e índice de dispersão obtidos (\mathcal{D}) pela técnica HPSEC.

Incremento de índice de refração (dn/dc)	Massa molar ponderal média (\bar{M}_w) ($g\ mol^{-1}$)	Massa molar numérica média (\bar{M}_n) ($g\ mol^{-1}$)	\mathcal{D} (dispersão \bar{M}_w/\bar{M}_n)
0,144 mL g^{-1}	1,37.10 ⁵ (6%)	7,623.10 ⁴ (15%)	1,798 ± 0,291

A porcentagem ao lado do valor indica o erro associado a análise.

O perfil obtido para o alginato corresponde a uma amostra polidispersa, confirmada pela polidispersão de massas molares $\mathcal{D} > 1$.

Com o uso da técnica de RMN foi possível calcular, através da análise da região anomérica, característica do ácido gulurônico, a proporção de blocos M e blocos G do

alginato utilizados na síntese do nanogel (Figura 43). O resultado obtido, 1,6 reflete uma maior quantidade do bloco M.

Este parâmetro influencia diretamente a capacidade de formar géis através de reações de reticulação cruzada com íons divalentes, uma vez que é um fato bem conhecido que os alginatos com uma baixa relação M/G produzem estruturas mais fortes devido à alta afinidade dos blocos G em relação aos íons, em contrapartida, os alginatos com uma elevada relação M/G possuem propriedades elásticas promissoras e são capazes de formar géis em meios ácidos (HUAMANI-PALOMINO *et al.*, 2021; MASUELLI; ILLANES, 2014).

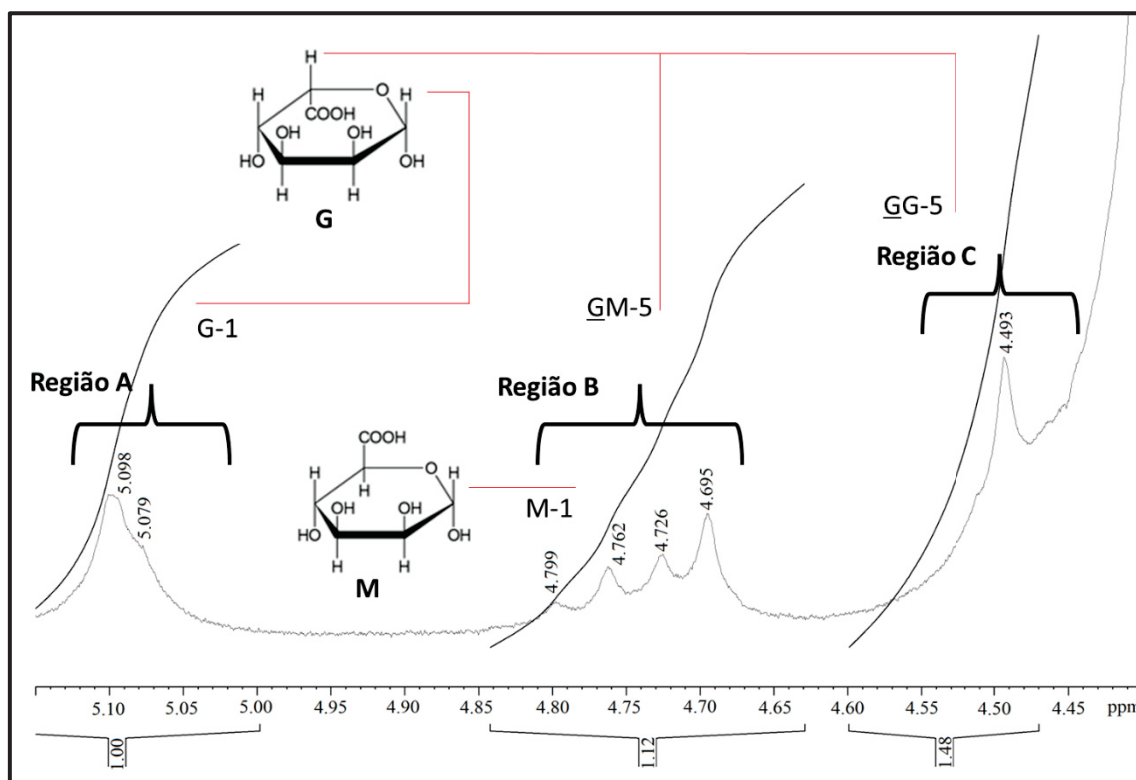


Figura 43 Espectro de 1H RMN da amostra de alginato de sódio – região anomérica juntamente com a representação das regiões referentes a cada hidrogênio dos monômeros G e M.

$$\frac{M}{G} = \frac{I_B + I_C - I_A}{I_A} = \frac{1,12 + 1,48 - 1}{1} = 1,6$$

(equação 5)

Tanto os resultados obtidos para a massa molar, como os resultados da proporção de blocos M e G, estão de acordo com valores relatados por outros autores que estudaram alginatos utilizados para fins comerciais e/ou industriais (MASUELLI; ILLANES, 2014).

4.4.2 Nanogel de Alginato com Própolis

Durante a síntese do Nanogel, após a adição do $ZnSO_4$, o frasco reacional foi deixado sob agitação constante por 40 minutos. Essa otimização da síntese foi feita para garantir que a reticulação fosse a maior possível, uma vez que se encontrou, durante a caracterização do alginato, uma maior proporção de blocos M que são menos favoráveis à formação da *egg-box*.

Além disso, sabe-se que o cátion mais comumente utilizado no método de gelificação é o Ca^{2+} , devido à sua biocompatibilidade e afinidade com o alginato. Porém, nesse trabalho houve um interesse em utilizar-se o cátion Zn^{2+} , uma vez que um dos objetivos é desenvolver nanopartículas com atividade cicatrizante, e o zinco tem papel importante no processo de cicatrização, além disso, possui ação antimicrobiana (HOSEIN FARZAEI *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2018).

Considerando que o sistema formado é uma dispersão coloidal, pode-se dizer que o nanogel está sujeito à instabilidade, podendo sofrer aglomeração das partículas, que é um fenômeno tipicamente observada nesse tipo de sistema. É desejável para um sistema coloidal que as forças de repulsão entre as partículas sejam suficientemente fortes, para que se as partículas se afastem antes de se aproximarem o suficiente para que as forças atrativas se tornem efetivas, fazendo com que não haja aglutinação. As medidas de potencial Zeta, há muito tempo, servem como um indicador de estabilidade de dispersão contra agregação, sendo que valores entre ± 25 e ± 30 mV são habitualmente considerados estáveis contra a agregação (LOWRY *et al.*, 2016; SCHIFINO, 2013). Por isso, após a finalização da síntese, a sua eficácia foi monitorada com medidas de tamanho de partícula com o uso de DLS, e medidas de densidade de carga com o uso do potencial Zeta. Inicialmente, no Instituto CNR-Nanotec foi feito o acompanhamento da síntese e estabilidade do nanogel durante 4 semanas. Os resultados podem ser vistos na Tabela 8.

Tabela 8. Acompanhamento do tamanho e carga superficial das partículas obtidas no equipamento Zetasizer Nano ZS90 ao longo do tempo de 24 dias como forma de avaliar a formação e a estabilidade do nanogel em meio aquoso

		Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 10	Dia 17	Dia 24
Nanogel Sem própolis	ζ (mV)	-32,7	-33,1	-34,8	-27,2	-2,45	-6,21
	Tamanho (nm)	405	317	435,7	387,9	345	444
Nanogel com própolis	ζ (mV)	-32,2	-32,2	-33,1	-30,2	-30,9	-33
	Tamanho (nm)	148	152,7	147,9	165,3	159,7	178

Pode-se perceber que o nanogel sem própolis começou a mudar sua densidade carga superficial a partir do 10º dia, demonstrando possível perda das suas propriedades físico-químicas originais. Já o nanogel contendo própolis manteve suas propriedades de carga e tamanho de partícula até o último dia da análise, demonstrando maior estabilidade coloidal. Pode-se afirmar então, que a presença da própolis, auxiliou na manutenção das suas propriedades físico-químicas originais e beneficiou a estabilização do sistema.

Nas sínteses subsequentes, feitas no Brasil, a carga superficial e os tamanhos obtidos para as partículas foram muito semelhantes, mesmo que as condições ambientais, os equipamentos, os lotes de reagentes e os equipamentos de análise tenham sido diferentes, evidenciando a robustez da técnica de gelificação iônica. Os resultados podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9. Acompanhamento do tamanho, por intensidade de luz espalhada, e carga superficial das partículas obtidas no equipamento ZetaSizer Nano ZS (FURB) em triplicata.

		Após síntese		09 dias após a síntese	
Nanogel Sem própolis	ζ (mV)	-29,7	±6,9	-24,4	9,7
	Tamanho (nm)	226,5	PDI 0,5	230,9*	PDI 0,5
Nanogel com própolis	ζ (mV)	-29	5,3	-29,7	4,6
	Tamanho (nm)	195,1	PDI 0,5	207,2	0,4

* presença de aglomerados visíveis

Pelas imagens (Figura 44) pode-se perceber que houve a reticulação das cadeias de alginato na presença do Zn^{2+} , possibilitando a formação do nanogel nas duas condições testadas. É interessante notar que a própolis parece exercer forte influência na morfologia do nanogel (Figura 44 C), em que fica bem evidente a presença de um núcleo recoberto de alginato, e estruturas em forma de pequenos pontos que podem representar o zinco e a própolis. Na imagem 44 D de campo escuro, a luz difratada, refratada e refletida pelo zinco, de alta densidade eletrônica, faz com que pontos brilhantes apareçam. Já no Nanogel sem própolis (Figura 44 A e B), nota-se uma estrutura mais homogênea, sem a presença de núcleo. Por fim, na imagem Figura 45, é possível ver o formato globular do nanogel.

Um dado interessante é que a presença da própolis dentro do nanogel contribuiu para diminuição do tamanho da partícula após a diálise. Uma explicação seria a interação que os grupos funcionais da própolis fazem com os grupos funcionais livres do alginato auxiliando a contração das cadeias e diminuindo o tamanho das partículas, bem como, a reatividade desses grupos funcionais, impedindo a agregação das partículas entre si, esse

tipo de interação já foi relatado em trabalhos pré-existentes (EL-FEKY *et al.*, 2017; MAVUSO *et al.*, 2015; XUE *et al.*, 2015).

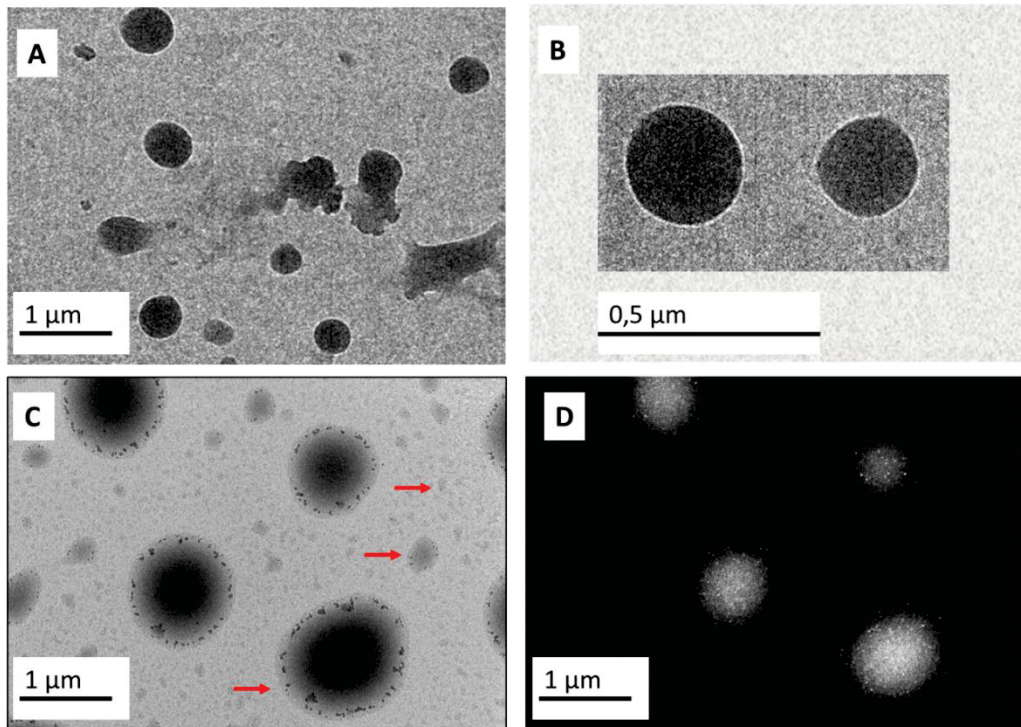


Figura 44 A. Imagem de MET obtida do nanogel reticulado com zinco A e B. sem própolis e C e D preenchido com própolis
as setas vermelhas indicam partículas com faixas de tamanhos variados. D representa o mesmo campo da imagem C obtido em campo escuro. As imagens A C e D com aumento de 5000 x e a imagem B com aumento de 10000 x.

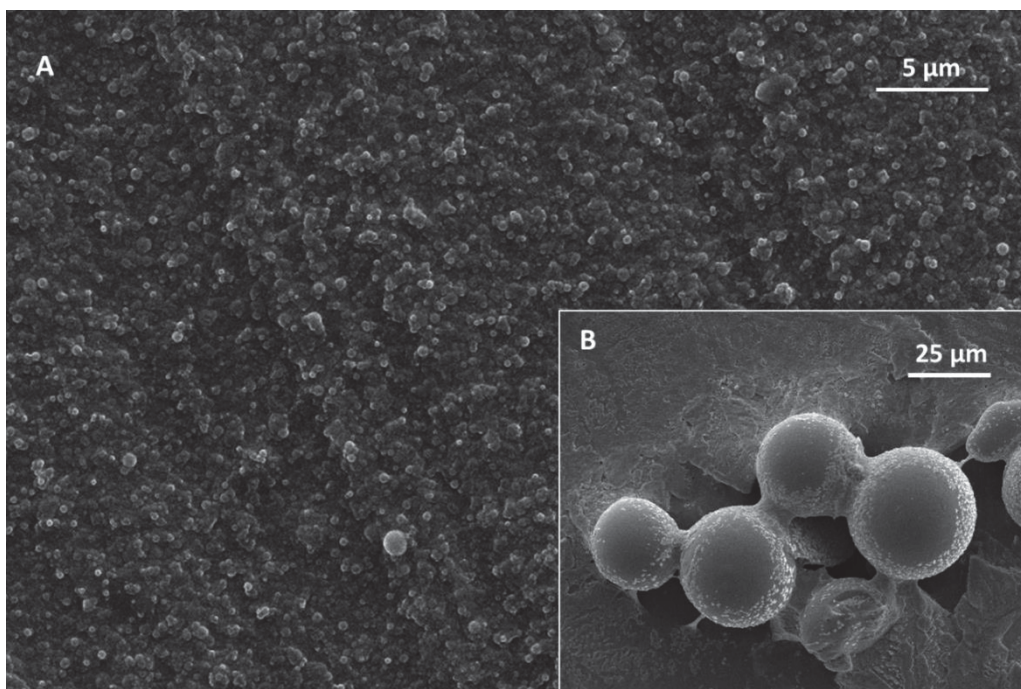


Figura 45 Imagens de MEV obtidas com o nanogel contendo própolis.
A. aumento de 5000 x e B. aumento de 1250 x.

4.4.2.1 Propriedades Espectroscópicas do Nanogel por FTIR

O espectro de FTIR-ATR obtido com o alginato em pó e o nanogel liofilizado sem própolis e com própolis pode ser visto na Figura 46. Para o alginato em pó algumas bandas clássicas podem ser vistas em 3270 cm^{-1} referente ao estiramento de $-\text{OH}$; em 1591 e 1409 cm^{-1} podem ser vistas as bandas do estiramento assimétrico e simétrico das ligações $\text{O}-\text{C}-\text{O}$, respectivamente; e finalmente em 1023 cm^{-1} pode-se ver o estiramento de $\text{C}-\text{O}$ (FERTAH *et al.*, 2017).

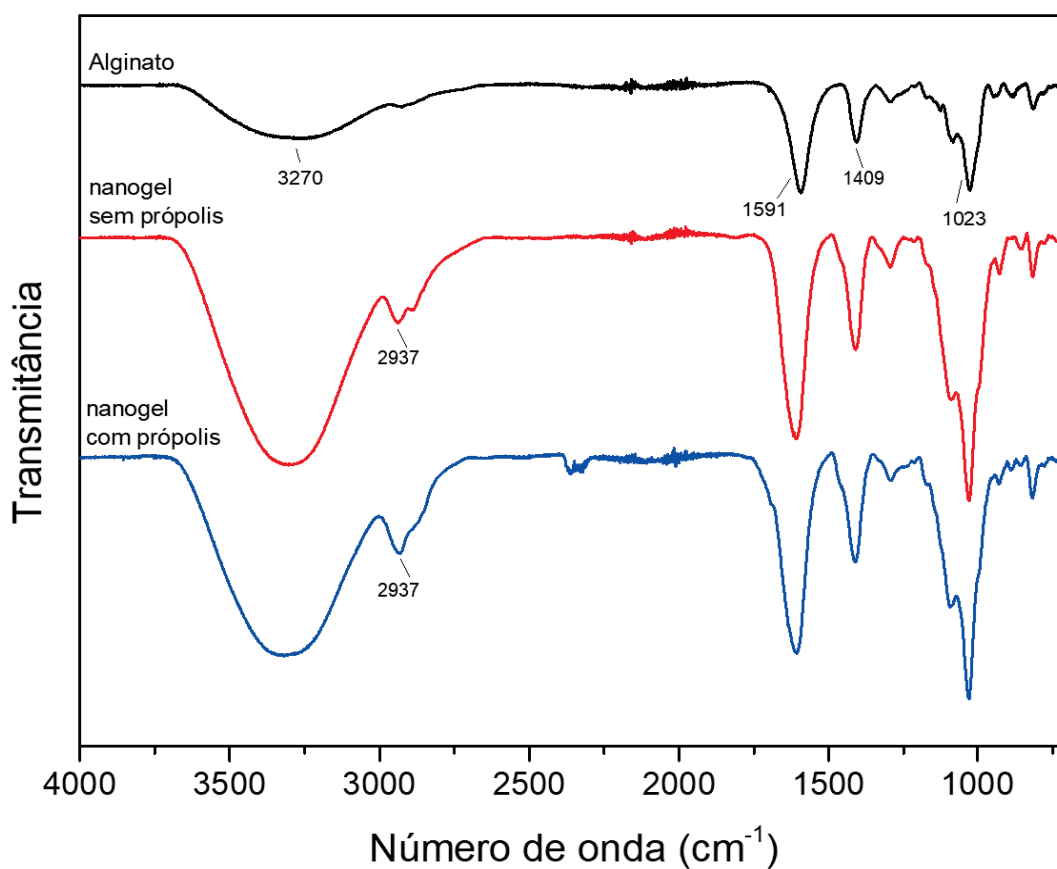


Figura 46 Espectro de FTIR-ATR obtidos com o alginato de sódio e do nanogel com própolis e sem própolis.

No espectro do nanogel com e sem própolis, pode-se notar a intensificação da banda em 2937 em relação ao alginato em pó que é referente ao estiramento de ligação $\text{C}-\text{H}$. Novamente não foi possível verificar bandas correspondentes à própolis, devido à própolis estar em concentração muito menor que o alginato.

4.4.2.2 Quantificação da Própolis Encapsulada e Estudo da Liberação a Partir do Nanogel

Para o cálculo da quantidade de própolis encapsulada, foram feitas medidas, de forma indireta, da própolis remanescente no sobrenadante. Os cálculos foram feitos em triplicata utilizando a equação 1 e os resultados podem ser vistos na Tabela 10.

Tabela 10. Dados experimentais da eficiência de encapsulação da própolis obtidos com a síntese do nanogel feita em triplicata

Replicata	1	2	3
Massa total de própolis (mg)	6,9	6,9	6,9
Massa remanescente no sobrenadante (mg)	1,5	1,48	1,17
% de encapsulação	78,26%	78,55	83,04%
Média de % de encapsulação	80%		

Pode-se afirmar então, que a partir dos cálculos reversos, tem-se um valor aproximado de eficiência de encapsulação de 80%. Esse valor é aproximado porque não é garantido que se consegue extrair toda a própolis do sobrenadante a partir da microextração com diclorometano. Também é possível que alguma quantidade de própolis tenha ficado aderida aos frascos reacionais, pipetas, cubetas etc. Contudo, esse valor de eficiência de encapsulação é considerado bastante satisfatório (ABNOOS *et al.*, 2018; DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016; XUE *et al.*, 2015).

Para conhecer mais sobre a estrutura macroscópica do Nanogel liofilizado (Figura 47 E), ele foi fotografado sob uma lâmpada UV. O nanogel contendo própolis (Figura 47 B) apresentou a mesma fluorescência observada com a própolis pura sob a mesma lâmpada (Figura 47 C). Houve uma suspeita de que a própolis era a responsável pela emissão da fluorescência, porém, ao fotografar o Nanogel sem própolis (Figura 47 A), observou-se a mesma fluorescência, apenas com menor intensidade. Fotografou-se então um Nanogel, sintetizado da mesma maneira, porém, reticulado com o íon Ca^{2+} , o qual não emitiu fluorescência (Figura 47 D). Pode-se concluir então que a participação do íon Zn^{2+} é importante para a emissão da fluorescência do Nanogel liofilizado.

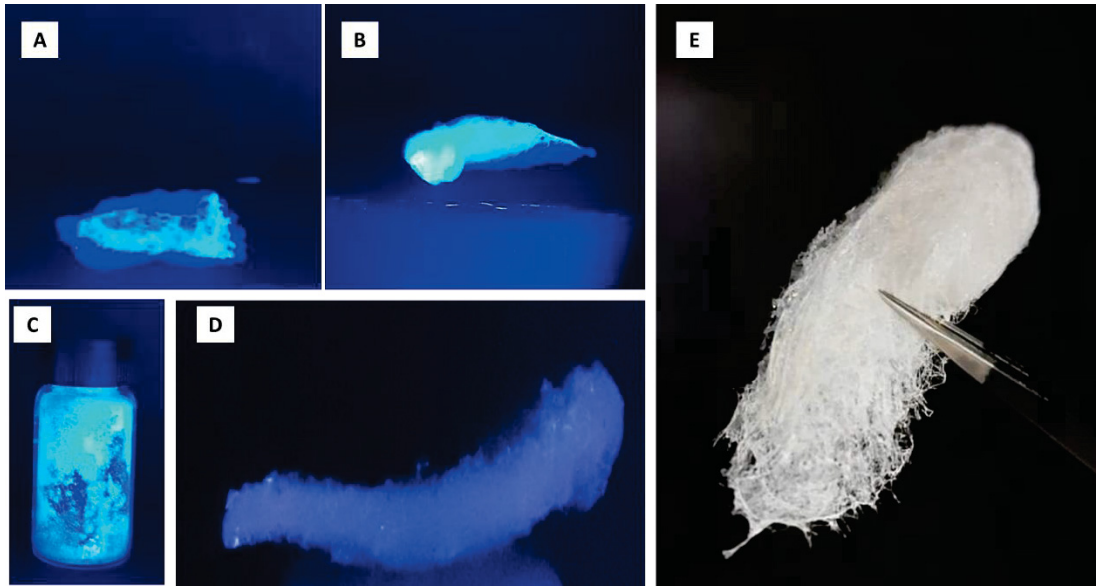


Figura 47 Fotos sob luz ultravioleta (A-D):
 A. Nanogel reticulado com Zn^{2+} liofilizado sem própolis; B. Nanogel reticulado com Zn^{2+} liofilizado contendo própolis; C. Extrato de própolis; D. Nanogel reticulado com Ca^{2+} ; E. Aspecto macroscópico do nanogel liofilizado.

Para os estudos de *drug-delivery* o nanogel foi utilizado na sua forma liofilizada (Figura 47 E). Uma quantidade conhecida do nanogel liofilizado foi pesada e acomodada dentro de membranas de diálise. As membranas foram então colocadas em contato com PBS em pH 7,4 e o tampão acetato de pH 5,3 acrescidos de DBS para garantir que a própolis tivesse alguma afinidade com o meio externo. A liberação foi acompanhada durante 30 h em intervalos de tempos predeterminados. Os perfis de liberação da própolis podem ser vistos na Figura 48.

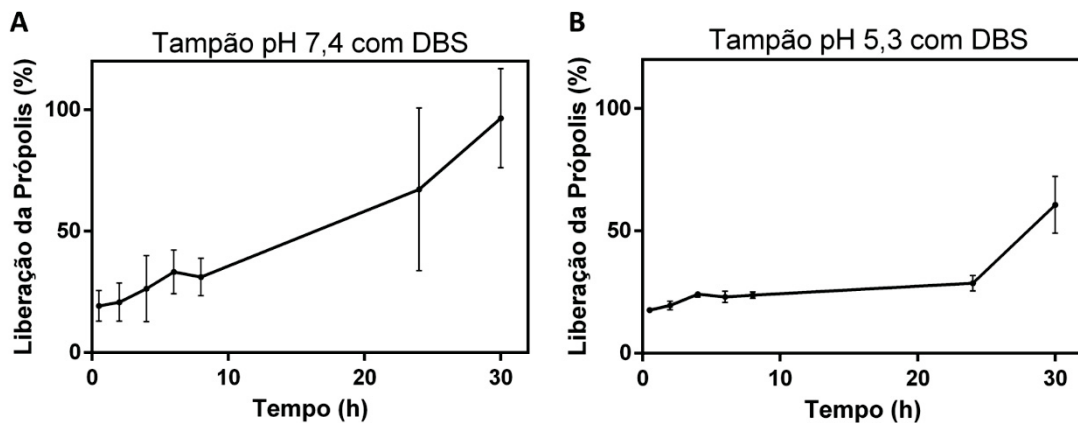


Figura 48 Perfil de liberação da própolis em tampão 7,4 e 5,3 ao longo do tempo a partir do nanogel reticulado com Zn^{2+} .
 Os pontos representam a média da triplicata junto com o desvio padrão.

Para as duas condições, é possível ver que após 30 min, já há cerca de 18% de própolis no meio receptor (efeito *Burst*), isso se deve ao fato de a própolis estar distribuída também na superfície do nanogel.

Para a liberação feita em pH 7,4, o valor da quantidade liberada de própolis variou bastante entre as triplicatas, o que levou a um alto desvio padrão. Isso pode ter ocorrido devido à distribuição não homogênea da própolis pelo nanogel no momento da síntese, o que pode ter levado à distribuição não homogênea da própolis no gel liofilizado. Ao final do tempo de 30 horas, observou-se que toda a própolis foi liberada para o meio.

Para o pH 5,3, já era esperado uma menor taxa de liberação uma vez que em ambientes ácidos o alginato tende a gelificar, ou seja, o aumento das interações entre as cadeias impede a saída da própolis (JING JIE CHIA *et al.*, 2022). Ao final do tempo de 30 horas, observou-se que cerca de 60% da própolis foi liberada.

A sensibilidade ao pH e a força iônica de hidrogéis é um fator importante para projetar materiais que sirvam para a liberação controlada de ativos no trato gastrointestinal, que tem uma variação de pH do estômago (~1,2) para o intestino (~7,4) (ABD EL-GHAFFAR *et al.*, 2012; POSTOLOVIC *et al.*, 2022). Assim, é esperado que nanogéis formados por biopolímeros inchem e afrouxem as suas cadeias quando em contato com um bom solvente. Com o afrouxamento das cadeias o conteúdo pode então migrar por difusão para o ambiente externo (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2016). Conforme trabalho realizado por DA SILVA *et al.* (2022), hidrogéis de alginato reticulado com zinco, quando em contato com soluções contendo Na^+ e Ca^{2+} , tendem a trocar os íons Zn^{2+} pelos íons Na^+ e Ca^{2+} , promovendo o inchamento das cadeias poliméricas.

h (AHMED *et al.*, 2019). Os parâmetros cinéticos obtidos nesse estudo utilizando os modelos de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Modelos cinéticos e os parâmetros obtidos pela liberação da própolis a partir do nanogel. São apresentados os valores de R^2 de cada modelo: primeira ordem e Korsmeyer-Peppas.

Modelo	Primeira Ordem		Korsmeyer-Peppas		
	R^2	k	R^2	k_p	n
pH 5,3	0,96	0,04 ± 0,01	0,99	117,10 ± 7,39	0,12 ± 0,01
pH 7,4	0,91	0,03 ± 0,01	0,99	90,37 ± 20,64	0,20 ± 0,04

Para a liberação em pH 5,3 os modelos cinéticos de primeira ordem e de Korsmeyer-Peppas obtiveram bons valores de R^2 , enquanto para a liberação feita em tampão com pH 7,4 apenas o modelo de Korsmeyer-Peppas se ajustou adequadamente.

Em termos de magnitude das constantes de velocidade (k) os valores em pH 5,3 e 7,4 foram próximos, indicando uma velocidade média levemente superior em pH = 5,3. Para uma reação de primeira ordem, classicamente a concentração dos reagentes diminui exponencialmente com o tempo, assim como a velocidade da reação também diminui (FOSCA; RAU; USKOKOVIĆ, 2022). No caso de estudos de *drug-release*, as matrizes

liberam o fármaco de forma proporcional à quantidade de fármaco remanescente em seu interior, de modo que a quantidade de fármaco liberada por unidade de tempo diminui (SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009). No entanto, o modelo cinético de primeira ordem não fornece informações sobre os mecanismos de liberação (AHMED et al., 2019).

O modelo de Korsmeyer-Peppas é um modelo semiempírico capaz de descrever a liberação de até 60% do fármaco a partir de sistemas poliméricos, como hidrogéis. Nessa equação, k_p é diretamente proporcional à velocidade de difusão do ativo e, portanto, depende das propriedades físicas e estruturais da matriz polimérica, enquanto n está relacionado ao mecanismo que governa a cinética de liberação (FOSCA; RAU; USKOKOVIĆ, 2022; JANITHA M. UNAGOLLA; AMBALANGODAGE C. JAYASURIYA, 2018; WU et al., 2019).

Ao analisar o valor de k_p pode-se constatar que para o pH 5,3, o valor médio foi maior. No entanto, ao considerar os desvios-padrão, não há diferença significativa. O alto valor de desvio-padrão para o pH 7,4, pode estar relacionado com a polidispersão de tamanhos do nanogel e pela distribuição não homogênea da própolis na matriz. O valor de n foi de 0,12 e de 0,2 para o pH 5,3 e 7,4 respectivamente. Nesse modelo, valores de n entre 0 e 0,45 são representativos de sistemas caracterizados por liberação pela difusão de Fick quando existem nanopartículas polidispersas no sistema estudado (FOSCA; RAU; USKOKOVIĆ, 2022; JANITHA M. UNAGOLLA; AMBALANGODAGE C. JAYASURIYA, 2018; SAMAHA; SHEHAYEB; KYRIACOS, 2009).

Sobre o exposto, apesar do mecanismo de liberação ter ocorrido por difusão nos dois valores de pH, o modelo de Korsmeyer-Peppas auxiliou no entendimento desse mecanismo, evidenciando que no tampão de pH 5,3, o meio ácido exerceu influência de modo a dificultar e prolongar a liberação da própolis para o meio receptor, o que era esperado. Para o pH 7,4, o maior afrouxamento das cadeias facilitou a difusão da própolis ao fluido receptor. Sobretudo, o fato de ter ocorrido uma liberação maior no tampão PBS, e menor no tampão acetato (ácido), indica que o nanogel sintetizado nesse trabalho, é responsivo ao meio no qual ele é colocado.

5. CONCLUSÕES

Foi obtido um extrato de própolis rico em componentes apolares, onde foi possível identificar 27 moléculas pertencentes à classe de metabólitos secundários dos terpenos. Verificou-se que a própolis é compatível com fibroblastos normais (Balb/3T3), porém reduziu a migração celular de células de melanoma (B16-F10). Isso encorajou a incorporação da própolis nos nanodispositivos, em concentrações determinadas como seguras.

Com a caracterização das dispersões de zeína e própolis foi possível compreender o comportamento do polímero frente ao extrato. A zeína, por possuir uma face hidrofóbica, formou uma perfeita combinação com a própolis, e essa interação favoreceu a formação de um material com uma superfície favorável aos testes biológicos.

As fibras de zeína e própolis demonstraram possuir biocompatibilidade frente aos fibroblastos ao mesmo tempo que interferiram na viabilidade das células tumorais. Esse resultado foi bastante animador, pois pode-se dizer que as fibras não prejudicam as células normais da pele, ao mesmo tempo são tóxicas para as células tumorais. Esse fato dá embasamento para futuras pesquisas com esse material.

O nanogel de alginato de sódio reticulado com Zn^{2+} foi produzido, caracterizado e a quantidade de própolis incorporada foi determinada. Com isso, foi possível conhecer o perfil e mecanismo de liberação da própolis em diferentes valores de pH. Sugere-se que o nanogel obtido melhora a solubilidade da própolis em meio aquoso, e é capaz de diminuir a degradação em ambiente ácido e liberar a maior parte do seu conteúdo em pH entre 7 e 8. Dessa forma, o nanogel tem condições de servir como uma plataforma de liberação programada para a própolis.

REFERÊNCIAS

ABD EL-GHAFFAR, M. A. et al. PH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 2, p. 667–675, 2012.

ABNOOS, M. et al. Chitosan-alginate nano-carrier for transdermal delivery of pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 118, p. 1319–1325, 2018.

ABU-SEIDA, A. M. Effect of Propolis on Experimental Cutaneous Wound Healing in Dogs. **Hindawi**, v. 2015, 2015.

AHMED, L. et al. Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release. **International Journal of Latest Technology in Engineering, Management & Applied Science**, v. 8, n. 5, p. 52–56, 2019.

AKINALAN BALIK, B.; ARGIN, S. Role of rheology on the formation of Nanofibers from pectin and polyethylene oxide blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 3, 2020.

ALBERTI, T. et al. Research Open Effect of Propolis Nanoparticles on Early-Stage Wound Healing in a Diabetic Noncontractile Wound Model. **Nanotechnology and Advanced Material Science**, v. 2, n. 1, 2019.

ALGHARIB, S. A. et al. Preparation of chitosan nanoparticles by ionotropic gelation technique: Effects of formulation parameters and in vitro characterization. **Journal of Molecular Structure**, v. 1252, 2022.

ALHANATI, L. S. **Alfa Connections**. Disponível em:
<<https://www.alfaconnection.pro.br/fisica/fisicoquimica/tensao-superficial/conceitos-basicos/>>.
Acesso em: 11 out. 2021.

ALI, A. M.; KUNUGI, H. Propolis, bee honey, and their components protect against coronavirus disease 2019 (Covid-19): A review of in silico, in vitro, and clinical studies. **Molecules**, v. 26, n. 5, 2021.

ALMEIDA, C. B. DE et al. Microstructure and thermal and functional properties of biodegradable films produced using zein. **Polímeros**, v. 5169, n. 1, p. 30–37, 2018.

ALTAN, A.; ÇAYIR, Ö. Encapsulation of carvacrol into ultrafine fibrous zein films via electrospinning for active packaging. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 26, n. 100581, 2020.

AMAN MOHAMMADI, M. et al. Electrospun Antibacterial and Antioxidant Zein/Poly(lactic Acid)/Hydroxypropyl Methylcellulose Nanofibers as an Active Food Packaging System. **Food and Bioprocess Technology**, v. 14, n. 8, p. 1529–1541, 2021.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A. Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1290, 2017.

AMJADI, S. et al. Reinforced ZnONPs/ rosemary essential oil-incorporated zein electrospun nanofibers by κ -carrageenan. **Carbohydrate Polymers**, v. 232, n. 115800, 2020.

AMOROS, M. et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of natural products**, v. 55, n. 12, p. 1732–1740, 1992.

AMOROS, M. et al. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methylbut-2-enyl caffeate. **Journal of natural products**, v. 57, n. 5, p. 644–647, 1994.

ANJUM, S. I. et al. Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2018.

ANTON PAAR. **Reômetros Modulares Compactos**, 2022.

ANVARIFARD, P. et al. A comprehensive insight into the molecular and cellular mechanisms of the effects of Propolis on preserving renal function: a systematic review. **Nutrition and Metabolism**, v.

19, n. 1, p. 1–23, 2022.

ARANCI, K. et al. 3D Propolis-Sodium Alginate Scaffolds: Influence on Structural Parameters, Release Mechanisms, Cell Cytotoxicity and Antibacterial Activity. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 21, 2020.

ARTEAGA, O.; EL-HACHEMI, Z.; OSSIKOVSKI, R. Snapshot circular dichroism measurements. **Optics Express**, v. 27, n. 5, p. 6746, 2019.

ASAWAHAME, C. et al. Formation of orally fast dissolving fibers containing propolis by electrospinning technique. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 42, n. 2, p. 469–480, 2015.

ASGARI, S.; BAGHERI, H.; ES-HAGHI, A. Imprinted silica nanofiber formation via sol-gel-electrospinning for selective micro solid phase extraction. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 16, p. 13864–13872, 2018.

AWALE, S. et al. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 181–189, 2008.

BANKOVA, V. et al. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1432–38, 2014.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central journal**, v. 8, n. 28, p. 1–8, 2014a.

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central journal**, v. 8, n. 1, p. 28, 2014b.

BARBEDO, T. et al. Antioxidants extraction from Pinhão (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) coats and application to zein films. **Food Packaging and Shelf Life**, 2017.

BARRETO, R. S. S. et al. A systematic review of the wound-healing effects of monoterpenes and iridoid derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 846–862, 2014.

BECK, M. I.; TOMKA, I.; WAYSEK, E. Physico-chemical characterization of zein as a film coating polymer: A direct comparison with ethyl cellulose. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 141, p. 137–150, 1996.

BESERRA, F. P. et al. Artepillin C as an outstanding phenolic compound of Brazilian green propolis for disease treatment: A review on pharmacological aspects. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 5, p. 2274–2286, 2021.

BETEG, F.; STANCU, B.; PASCU, C. Propolis - An ancient remedy or a new paradigm for wound healing: in-vivo preclinical evaluation, antimicrobial activity and histopathologic aspects. **Rev Rom Med Vet**, v. 1, n. December, p. 12–17, 2019.

BHARGAVA, P. et al. Experimental evidence for therapeutic potentials of propolis. **Nutrients**, v. 13, n. 8, p. 1–23, 2021.

BICUDO, T. C. et al. Y-Zein Secondary Structure in Solution by Circular Dichroism. **Biopolymers**, v. 89, n. 3, p. 175–178, 2007.

BILGINER, R. et al. Biocomposite scaffolds for 3D cell culture: Propolis enriched polyvinyl alcohol nanofibers favoring cell adhesion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 138, n. 17, p. 1–9, 2021.

BONINO, C. A. et al. Electrospinning alginate-based nanofibers : From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 111–119, 2011.

BRACCINI, I.; GRASSO, R. P.; PÉREZ, S. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: A molecular modeling investigation. **Carbohydrate Research**, v. 317, n. 1–4, p. 119–130, 1999.

BRACCINI, I.; PÉREZ, S. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The egg-box model revisited. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1089–1096, 2001.

BRAHATHEESWARAN, D. et al. Hybrid fluorescent curcumin loaded zein electrospun nanofibrous

scaffold for biomedical applications. **Biomedical Materials**, v. 7, 2012.

BRUGGISSER, R. et al. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Medica**, v. 68, n. 5, p. 445–448, 2002.

BURIOL, L. et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: Uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296–302, 2009.

BUSCH, V. M. et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227–35, 2017.

CABRA, V. et al. The effect of sulfhydryl groups and disulphide linkage in the thermal aggregation of Z19 α -zein. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1784, n. 7–8, p. 1028–1036, 2008.

CALHELHA, R. C. et al. Cytotoxicity of portuguese propolis: The proximity of the in vitro doses for tumor and normal cell lines. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

CALVO, P. et al. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125–132, 1997.

CAMARGO, E. R. et al. Bioactive response of PMMA coating obtained by electrospinning on ISO5832-9 and Ti6Al4V biomaterials. **Surface and Coatings Technology**, v. 412, n. 127033, 2021.

CAMPIGLIO, C. E. et al. Cross-linking optimization for electrospun gelatin: Challenge of preserving fiber topography. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 1–15, 2020.

CAMPOCCIA, D. et al. Exploring the anticancer effects of standardized extracts of poplar-type propolis: In vitro cytotoxicity toward cancer and normal cell lines. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 141, n. 111895, 2021.

CAVO, M. et al. Electrospun nanofibers in cancer research: From engineering of: From vitro 3D cancer models to therapy. **Biomaterials Science**, v. 8, n. 18, p. 4887–4905, 2020.

CHAN, L. W.; LEE, H. Y.; HENG, P. W. S. Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 176–187, 2006.

CHEN, J. T. et al. Effect of thermal annealing on the surface properties of electrospun polymer fibers. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 35, n. 3, p. 360–366, 2014.

CHIU, H.-F. et al. Chemopreventive and Chemotherapeutic Effect of Propolis and Its Constituents: A Mini-review. **Journal of Cancer Prevention**, v. 25, n. 2, p. 70–78, 2020.

CHOI, J.-H.; KIM, Y.-H.; YEUM, J.-H. Effect of Ethanol/water Solvent Ratios on the Morphology of Zein Nanofiber Mats and their Wettability. **Textile Coloration and Finishing**, v. 23, n. 4, p. 227–232, 2011.

CISILOTTO, J. et al. Cytotoxicity mechanisms in melanoma cells and UPLC-QTOF / MS 2 chemical characterization of two Brazilian stingless bee propolis : Uncommon presence of piperidinic alkaloids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 149, p. 502–511, 2018.

COELHO, S. C. et al. Optimization of electrospinning parameters for the production of zein microstructures for food and biomedical applications. **Micron**, v. 152, n. April 2021, 2022.

COLLINS, G.; FEDERICI, J.; CATALANI, L. H. Charge generation , charge transport , and residual charge in the electrospinning of polymers : A review of issues and complications. **Journal of applied physics**, v. 111, n. 044701, 2012.

CONCEIÇÃO, M. et al. Histological, Immunohistochemical and Antioxidant Analysis of Skin Wound Healing Influenced by the Topical Application of Brazilian Red Propolis. **Antioxidants**, v. 11, n. 2188, 2022.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564–582, 1999.

- DA ROSA, C. et al. Healing Potential of Propolis in Skin Wounds Evidenced by Clinical Studies. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 9, p. 1–8, 2022.
- DA ROSA, C. G. et al. Application in situ of zein nanocapsules loaded with *Origanum vulgare* Linneus and *Thymus vulgaris* as a preservative in bread. **Food Hydrocolloids**, v. 99, n. 105339, 2020.
- DA SILVA, B. C. et al. On Demand Release of Cerium from an Alginate/Cerium Complex for Corrosion Protection of AISI1020 and AA2024 Substrates. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 33, n. 8, p. 987–996, 2022.
- DA SILVA, C. et al. Physical chemical study of zein and arabinogalactans or glucuronomannans polyelectrolyte complexes and their film-forming properties. **Food Hydrocolloids**, v. 100, n. 105394, 2020.
- DE OLIVEIRA, M. S. et al. Chemical composition of volatile compounds in *Apis mellifera* propolis from the northeast region of Pará state, Brazil. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 1–12, 2021.
- DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H. Polysaccharide based nanogels in the drug delivery system : Application as the carrier of pharmaceutical agents. **Materials Science & Engineering C**, v. 68, p. 964–981, 2016.
- DHANDAYUTHAPANI, B. et al. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application : A Review. **Hindawi**, v. 2011, n. ii, 2011.
- DING, Q. et al. Chinese Propolis: Ultrasound-assisted enhanced ethanolic extraction, volatile components analysis, antioxidant and antibacterial activity comparison. **Food Science and Nutrition**, v. 9, n. 1, p. 313–330, 2021.
- EL-FEKY, G. S. et al. Alginate coated chitosan nanogel for the controlled topical delivery of Silver sulfadiazine. **Carbohydrate Polymers**, v. 177, n. January, p. 194–202, 2017.
- EL ASHRY, E. S. H.; AHMAD, T. A. The use of propolis as vaccine's adjuvant. **Vaccine**, v. 31, n. 1, p. 31–39, 2012.
- ELBAZ, N. M. et al. Chitosan-based nano-in-microparticle carriers for enhanced oral delivery and anticancer activity of propolis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, n. July, p. 254–269, 2016.
- ELUMALAI, P. et al. An Insight into Anticancer Effect of Propolis and Its Constituents: A Review of Molecular Mechanisms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.
- ENGBERT, A.; PLANK, J. Templating effect of alginate and related biopolymers as hydration accelerators for calcium alumina cement - A mechanistic study. **Materials and Design**, v. 195, n. 109054, 2020.
- FALC, S. I. et al. In Vitro Interactions of Moroccan Propolis Phytochemical ' s on Human Tumor Cell Lines and Anti-Inflammatory Properties. **Biomolecules**, v. 9, n. 315, 2019.
- FAROKHI, M.; SHARIATZADEH, F. J.; SOLOUK, A. Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review Alginate Based Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering: A Review. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, p. 1–18, 2019.
- FERTAH, M. et al. Extraction and characterization of sodium alginate from Moroccan *Laminaria digitata* brown seaweed. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S3707–S3714, 2017.
- FIORINI, A. C. et al. Antiviral activity of Brazilian Green Propolis extract against SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syn- drome - Coronavirus 2) infection: case report and review. **Clinics**, v. 76, n. e2357, 2021.
- FOSCA, M.; RAU, J. V.; USKOKOVIĆ, V. Factors influencing the drug release from calcium phosphate cements. **Bioactive Materials**, v. 7, n. August 2021, p. 341–363, 2022.
- FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FRANÇA, M. **Própolis verde mineira conquista mercado internacional**. Disponível em: <http://www.emater.mg.gov.br/portal.do?flagweb=novosite_pagina_interna&id=24451>. Acesso em: 19 jul. 2020.

FRANCHI, G. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

FRI, Y. et al. The Cuban Propolis Component Nemorosone Inhibits Proliferation and Metastatic Properties of Human Colorectal Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1827, 2020.

GAROFULIC, I. E. et al. Retention of polyphenols in encapsulated sour cherry juice in dependence of drying temperature and wall material. **Food Science and Technology**, v. 83, p. 110–117, 2017.

GASTALDELLO, G. H. et al. Green Propolis Compounds (Baccharin and p-Coumaric Acid) Show Beneficial Effects in Mice for Melanoma Induced by B16f10. **Medicines**, v. 8, n. 20, 2021.

GHANBARZADEH, B. et al. Effect of plasticizing sugars on rheological and thermal properties of zein resins and mechanical properties of zein films. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 882–890, 2006.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109–113, 1986.

GOODWIN, J. W. **Colloids & Interfaces with Surfactant and Polymers: an introduction**. 1. ed. Chichester: Wiley, 2004.

GREENFIELD, N. J. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. **NIH Public Access**, v. 1, n. 6, p. 2876–2890, 2009.

GUPTA, M. et al. Zinc therapy in dermatology: A review. **Dermatology Research and Practice**, v. 2014, 2014.

HALLAJZADEH, J. et al. Effects of propolis supplementation on glycemic status, lipid profiles, inflammation and oxidative stress, liver enzymes, and body weight: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 20, n. 1, p. 831–843, 2021.

HAN, M. C. et al. Effects of Turkish Propolis and Silver Sulfadiazine on Burn Wound Healing in Rats. **Revue de médecine vétérinaire**, v. 156, n. 12, p. 624–627, 2005.

HANKS, C. T.; WATAHA, J. C.; SUN, Z. In vitro models of biocompatibility: a review. **Dental materials: official publication of the Academy of Dental Materials**, v. 12, n. 3, p. 186–193, 1996.

HAUG, ARNE; LARSEN, BJØRN; SMIDSRØD, O. A Study of the Constitution of Alginic Acid by Partial Acid Hydrolysis. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 20, p. 183–190, 1966.

HAUG, A.; LARSEN, B.; SMIDSRØD, O. Uronic acid sequence in alginate from different sources. **Carbohydrate Research**, v. 32, n. 2, p. 217–225, 1974.

HEYDARI-MAJD, M. et al. Enrichment of zein nanofibre assemblies for therapeutic delivery of Barije (*Ferula gummosa* Boiss) essential oil. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 54, n. 101290, 2019.

HOCHHEIM, S. **Fracionamento biomonitorado de própolis de *Melipona quadrifasciata* para isolamento e caracterização de compostos com atividade antibacteriana, antiviral e antioxidante**. [s.l.] Universidade Regional de Blumenau, 2017.

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**, 2019.

HOCHHEIM, S. et al. A Bioguided Approach for the Screening of Antibacterial Compounds Isolated From the Hydroalcoholic Extract of the Native Brazilian Bee's Propolis Using Mollicutes as a Model.

Frontiers in Microbiology, v. 11, n. April, p. 1–7, 2020.

HOSEIN FARZAEI, M. et al. A comprehensive review of plants and their active constituents with wound healing activity in traditional Iranian medicine. **Wounds: a compendium of clinical research and practice**, v. 26, n. 7, p. 197–206, 2014.

HOSSAIN, R. et al. Propolis: An update on its chemistry and pharmacological applications. **Chinese Medicine (United Kingdom)**, v. 17, n. 100, 2022.

HUAMANI-PALOMINO, R. G. et al. Functionalization of an alginate-based material by oxidation and reductive amination. **Polymers**, v. 13, n. 2, p. 1–15, 2021.

HUANG, S. et al. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 19610–19632, 2014.

HUHTAMÄKI, T. et al. Surface-wetting characterization using contact-angle measurements. **Nature Protocols**, v. 13, n. 7, p. 1521–1538, 2018.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 1, p. 107–124, 2011.

HUO, W. et al. High-elongation zein films for flexible packaging by synergistic plasticization: Preparation, structure and properties. **Journal of Cereal Science**, v. 79, p. 354–361, 2018.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5:2009(E). **International Standard: Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity**, 2009. Disponível em: <<http://nhiso.com/wp-content/uploads/2018/05/ISO-10993-5-2009.pdf>>. Acesso em: 4 ago. 2020

IONESCU, O. M. et al. Design, preparation and in vitro characterization of biomimetic and bioactive chitosan/polyethylene oxide based nanofibers as wound dressings. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 193, n. October, p. 996–1008, 2021.

IRIGOITI, Y. et al. The use of propolis as a functional food ingredient: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 115, n. March, p. 297–306, 2021.

JANITHA M. UNAGOLLA; AMBALANGODAGE C. JAYASURIYA. Drug Transport Mechanisms and In Vitro Release Kinetics of Vancomycin Encapsulated Chitosan-Alginate Polyelectrolyte Microparticles as a Controlled Drug Delivery System. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 114, p. 199–209, 2018.

JASKI, A. C. et al. Zein - a plant-based material of growing importance: New perspectives for innovative uses. **Industrial Crops and Products**, v. 186, n. 115250, 2022.

JENSEN, H. M.; LARSEN, F. H.; ENGELSEN, S. B. Characterization of Alginates by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and Vibrational Spectroscopy (IR, NIR, Raman) in Combination with Chemometrics. In: STENGEL, D. B.; CONNAN, S. (Eds.). **Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols**. [s.l.: s.n.]. v. 1308p. 1–439.

JING JIE CHIA et al. Preparation and Application of Cross-linked Alginate Nanoparticles as Drug Carrier: A Review. **Journal of Research in Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1–11, 2022.

KALAORA, S. et al. Mechanisms of immune activation and regulation: lessons from melanoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 22, n. 4, p. 195–207, 2022.

KARIM, M.; FATHI, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Incorporation of zein nanofibers produced by needle-less electrospinning within the casted gelatin film for improvement of its physical properties. **Food and Bioproducts Processing**, v. 122, p. 193–204, 2020.

KEIROUZ, A. et al. 2D and 3D electrospinning technologies for the fabrication of nanofibrous scaffolds for skin tissue engineering: A review. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 12, n. 4, p. 1–32, 2020.

KELLY, S. M.; JESS, T. J.; PRICE, N. C. How to study proteins by circular dichroism. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1751, n. 2, p. 119–139, 2005.

KHATRI, M. et al. Zein nanofibers via deep eutectic solvent electrospinning: tunable morphology

- with super hydrophilic properties. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2020.
- KIM, J. et al. Charged nanomatrices as efficient platforms for modulating cell adhesion and shape. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, v. 18, n. 12, p. 913–923, 2012.
- KUBILIENE, L. et al. Comparison of aqueous, polyethylene glycol-aqueous and ethanolic propolis extracts: Antioxidant and mitochondria modulating properties. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.
- LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering. **Chemical reviews**, v. 101, n. 7, p. 495–517, 2001.
- LEE, Y. S. **Self-Assembly and Nanotechnology**. 1. ed. New Jersey: Wiley, 2008.
- LI, Y. et al. Understanding the dissolution of α -zein in aqueous ethanol and acetic acid solutions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 39, p. 12057–12064, 2012.
- LIANG, C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. In vitro scratch assay : a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIN, P. et al. Zinc in Wound Healing Modulation. **Nutrients**, v. 10, n. 16, p. 1–20, 2018.
- LIU, W. et al. Encapsulation of β -carotene-loaded oil droplets in caseinate/ alginate microparticles: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. **Journal of functional foods**, v. 40, p. 527–535, 2018.
- LIU, Y. et al. Controlling numbers and sizes of beads in electrospun nanofibers. **Polymer International**, v. 57, p. 632–636, 2008.
- LOWRY, G. V. et al. Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 5, p. 953–965, 2016.
- LUZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 174–183, 2008.
- MADEKA, H.; KOKINI, J. L. Effect of glass transition and cross-linking on rheological properties of zein: Development of a preliminary state diagram. **Cereal Chemistry**, v. 73, n. 4, p. 433–438, 1996.
- MAIRE DU POSET, A. et al. Tuning the Structure of Galacturonate Hydrogels: External Gelation by Ca, Zn, or Fe Cationic Cross-Linkers. **Biomacromolecules**, v. 20, n. 7, p. 2864–2872, 2019.
- MARCUCCI, M. C. Propolis : chemical composition , biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, n. 1, p. 83–99, 1994.
- MARTINOTTI, S.; PELLAVIO, G.; LAFORENZA, U. Propolis Induces AQP3 Expression : A Possible Way of Action in Wound Healing. **Molecules**, v. 24, n. 1544, p. 1–12, 2019.
- MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Propolis: a new frontier for wound healing? **Burns & Trauma**, v. 3, n. 9, p. 1–7, 2015.
- MASUELLI, M. A.; ILLANES, C. O. Review of the characterization of sodium alginate by intrinsic viscosity measurements . Comparative analysis between conventional and single point methods. **International Journal of BioMaterials Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1–11, 2014.
- MAVUSO, S. et al. A Review of Polymeric Colloidal Nanogels in Transdermal Drug Delivery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 20, p. 2801–2813, 2015.
- MEWIS, J. Thixotropy - a general review. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 6, n. 1, p. 1–20, 1979.
- MOMANY, F. A. et al. Structural characterization of α -zein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 543–547, 2006.
- MORADKHANNEJHAD, L. et al. morphology investigation Electrospinning of zein/propolis nanofibers; antimicrobial properties and morphology investigation. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 29, n. 165, 2018.

- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- NOBILE, M. A. DEL et al. Antimicrobial efficacy and release kinetics of thymol from zein films. **Journal of Food Engineering**, v. 89, p. 57–63, 2008.
- OPSENICA, D. M. et al. TLC Fingerprinting and Pattern Recognition Methods in the Assessment of Authenticity of Poplar-Type Propolis. **Journal of Chromatografic Science**, v. 54, n. 7, p. 1077–1083, 2016.
- ORŠOLIĆ, N.; JAZVINŠČAK JEMBREK, M. Molecular and Cellular Mechanisms of Propolis and Its Polyphenolic Compounds against Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 18, 2022.
- PALUCH, E. K.; RAZ, E. The role and regulation of blebs in cell migration. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 25, n. 5, p. 582–590, 2013.
- PAQUES, J. P. et al. Preparation Methods of alginate nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 209, p. 163–171, 2014.
- PASCOLI, M.; DE LIMA, R.; FRACETO, L. F. Zein nanoparticles and strategies to improve colloidal stability: A mini-review. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JAN, p. 1–5, 2018.
- PAVIA, D. L. et al. **Introdução a Espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage, 2012.
- PELIPENKO, J. et al. The topography of electrospun nanofibers and its impact on the growth and mobility of keratinocytes. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 2, p. 401–411, 2013.
- PÉREZ-RECALDE, M.; RUIZ ARIAS, I. E.; HERMIDA, É. B. Could essential oils enhance biopolymers performance for wound healing? A systematic review. **Phytomedicine**, v. 38, n. September 2017, p. 57–65, 2018.
- PISTONE, S. et al. Formulation and preparation of stable cross- linked alginate-zinc nanoparticles in the presence of monovalent salt. **Soft Matter**, v. 0, n. 1–3, p. 1–11, 2013.
- PIZZOFERRATO, A. et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. **Clinical materials**, v. 15, n. 3, p. 173–190, 1994.
- POBIEGA, K.; KRASNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Trends in Food Science & Technology Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 53–62, 2019.
- POPOVA, M.; TRUSHEVA, B.; BANKOVA, V. Propolis of stingless bees: A phytochemist's guide through the jungle of tropical biodiversity. **Phytomedicine**, v. 86, n. 153098, 2021.
- POSTOLOVIC, K. . et al. pH-Responsive Hydrogel Beads Based on Alginate, κ -Carrageenan and Poloxamer for Enhanced Curcumin, Natural Bioactive Compound, Encapsulation and Controlled Release Efficiency. **Molecules**, v. 27, n. 4045, 2022.
- PRASHANT TIWARI, B.; KUMAR, M. K.; GURPREET KAUR, H. K. Phytochemical screening and extraction - A review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v. 1, n. 1, p. 98–106, 2011.
- PRATSINIS, H. et al. Antiproliferative activity of Greek propolis. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 2, p. 286–290, 2010.
- RAMLI, N. A. et al. Physicochemical characteristics of liposome encapsulation of stingless bees' propolis. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06649, 2021.
- RAZAVIZADEH, B. M.; NIAZMAND, R. Characterization of polyamide-6/ propolis blended electrospun fibers. **Heliyon**, v. 6, n. 8, p. e04784, 2020.
- REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015.
- REPETTO, G.; PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–1131, 2008.

- RIBEIRO, A. B. et al. Guttiferone E Displays Antineoplastic Activity Against Melanoma Cells. **Planta Medica**, v. 14, 2022.
- RIPARI, N. et al. Propolis antiviral and immunomodulatory activity: A review and perspectives for COVID-19 treatment. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, p. 281–299, 2021.
- ROŠIĆ, R. et al. The role of rheology of polymer solutions in predicting nanofiber formation by electrospinning. **European Polymer Journal**, v. 48, n. 8, p. 1374–1384, 2012.
- ROY, A. et al. In vitro techniques to assess the proficiency of skin care cosmetic formulations. **Pharmacognosy reviews**, v. 7, n. 14, 2013.
- ROY, S.; SHARMA, A. Self-organized morphological evolution and dewetting in solvent vapor annealing of spin coated polymer blend nanostructures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 449, p. 215–225, 2015.
- ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **Chemspider: search and share chemistry**. Disponível em: <<http://www.chemspider.com>>. Acesso em: 29 jul. 2020.
- SALATINO, A. Perspectives for uses of propolis in therapy against diseases. **Medical Clinics of North America**, v. 27, n. 4594, 2022.
- SALVATI, B.; SANTAGAPITA, P.; PERULLINI, M. Exploring the conditions to generate alginate nanogels. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 102, n. 1, p. 142–150, 2022.
- SAMAHA, D.; SHEHAYEB, R.; KYRIACOS, S. Modeling and comparison of dissolution profiles of diltiazem modified-release formulations. **Dissolution Technologies**, v. 16, n. 2, p. 41–46, 2009.
- SANTOS, L. et al. Chemical characterization, antioxidant, cytotoxic and antibacterial activity of propolis extracts and isolated compounds from the Brazilian stingless bees *Melipona quadrifasciata* and *Tetragonisca angustula*. **Journal of Apicultural Research**, v. 56, n. 5, p. 543–558, 2017.
- SCHIFINO, J. **Tópicos de Físico-Química**. 1. ed. Porto Alegre: UFRGS Editora, 2013.
- SCHWARTZ, J. R.; MARSH, R. G.; DRAELOS, Z. D. Zinc and skin health: overview of physiology and pharmacology. **Dermatologic surgery**, v. 31, n. 7 Pt 2, p. 837–847, 2005.
- SELLING, G. W.; SESSA, D. J. Effect of Solvent and Temperature on Secondary and Tertiary Structure of Zein by Circular Dichroism. v. 84, n. 3, p. 265–270, 2007.
- SHAW, D. J. **Introduction to Colloid & Surface Chemistry**. 4. ed. Oxford: Elsevier, 1992.
- SIMAS-TOSIN, F. F. et al. Polysaccharides as Green Biodegradable Platforms for Building-up Electroactive Composite Materials : An Overview. In: **Handbook of Composites from Renewable Materials: Biodegradable Materials**. [s.l.] Wiley, 2017. p. 377–418.
- SOLEIMANIFARD, M.; FEIZY, J.; MAESTRELLI, F. Nanoencapsulation of propolis extract by sodium caseinate-maltodextrin complexes. **Food and Bioproducts Processing**, v. 128, p. 177–185, 2021.
- SOMAYAJI, A.; SHASTRY, C. S. Interference of Antioxidant Flavonoids with MTT Tetrazolium Assay in a Cell Free System. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 33, p. 76–83, 2021.
- STOJKO, M.; WOLNY, D.; WŁODARCZYK, J. Nonwoven releasing propolis as a potential new wound healing method - a review. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 1–24, 2021.
- SULTANA, F. et al. An overview of nanogel drug delivery system. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 8 SUPPL, p. 95–105, 2013.
- SUN, Z. et al. A microscopic approach to studying colloidal stability. **Journal of Chemical Physics**, v. 119, n. 4, p. 2399–2405, 2003.
- SUNDARAMURTHY, A.; SUNDRAMOORTHY, A. K. Macromolecules Polyelectrolyte capsules preloaded with interconnected alginate matrix: An effective capsule system for encapsulation and release of macromolecules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2251–2261, 2018.

- TATLI SEVEN, P. et al. Nanotechnology and nano-propolis in animal production and health: an overview. **Italian Journal of Animal Science**, v. 17, n. 4, p. 921–930, 2018.
- TAZAWA, S. et al. Discovery of a Novel Diterpene in Brown Propolis from the State of Parana, Brazil. **NPC**, v. 11, n. 2, p. 201–205, 2015.
- TEERASRIPREECHA, D. et al. In vitro antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai Apis mellifera propolis. **BMC Complement Altern Med.**, v. 30, n. 12, p. 27, 2012.
- TONG KONG, Y.; VELOO KUTTY, R. Physical characterization of propolis encapsulated vitamin E TPGS as nanomedicine. **Materials Today: Proceedings**, 2021.
- TORETI, V. C. et al. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- TRAN, T. D. et al. Lessons from exploring chemical space and chemical diversity of propolis components. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 1–35, 2020.
- TRUSHEVA, B. et al. Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. **Chemistry Central journal**, v. 4, p. 8, 2010.
- ULAG, S. et al. Propolis-Based Nanofiber Patches to Repair Corneal Microbial Keratitis. **molecules**, v. 26, n. 2577, 2021.
- VALVERDE, M. **Diário do comércio**. Disponível em: <<https://diariodocomercio.com.br/agronegocio/apicultura-mineira-disputa-realizacao-de-congresso-para-fortalecer-propolis-verde/>>. Acesso em: 4 out. 2021.
- VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An Overview of Colorimetric Assay Methods Used to Assess Survival or Proliferation of Mammalian Cells. **Proc. West Pharmacol. Soc.**, v. 54, p. 10–14, 2011.
- VILLALOBOS, K. et al. Production of Starch Films Using Propolis Nanoparticles as Novel Bioplasticizer. **Journal of Renewable Materials**, v. 5, n. 3, p. 189–198, 2017.
- WAINWRIGHT, C. L. et al. Future directions for the discovery of natural product-derived immunomodulating drugs: an IUPHAR positional review. **Pharmacological Research**, v. 177, n. January, 2022.
- 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, p. 1–7, 2021.
- WU, I. Y. et al. Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 138, n. June, 2019.
- XUE, Y. et al. A green and facile method for the preparation of a pH-responsive alginate nanogel for subcellular delivery of doxorubicin. **RSC Advances**, v. 5, n. 90, p. 73416–73423, 2015.
- YALCINKAYA, F.; YALCINKAYA, B.; JIRSAK, O. Dependent and independent parameters of needleless electrospinning. In: **Electrospinning - Material, Techniques, and Biomedical Applications**. Liberec: Intech, 2016. p. 67–93.
- YANG, J. et al. Research Progress on Therapeutic Effect and Mechanism of Propolis on Wound Healing. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2022, 2022.
- YAO, C.; LI, X.; SONG, T. Electrospinning and Crosslinking of Zein Nanofiber Mats. **Electrospinning and Crosslinking of Zein Nanofiber Mats**, v. 103, p. 380–385, 2006.
- YE, K. et al. Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering with Drug Loading and Release. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 182, p. 1–17, 2019.
- YONG, H.; LIU, J. Active packaging films and edible coatings based on polyphenol-rich propolis extract: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 2, p. 2106–2145, 2021.
- YU, X. et al. Study on Self-Assembled Morphology and Structure Regulation of α -Zein in Ethanol-

Water Mixtures. **Langmuir**, v. 36, n. 40, p. 11975–11984, 2020.

YUAN, D. et al. Recent advances in the application of zein-based gels: A review. **European Polymer Journal**, v. 179, n. September, p. 111557, 2022.

ZAHEDI, P. et al. A review on wound dressings with an emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, n. 2, p. 77–95, fev. 2010.

ZHANG, X. et al. Zein as a structural protein in gluten-free systems: an overview. **Food Science and Human Wellness**, v. 10, n. 3, p. 270–277, 2021.

ZHAO, S. et al. Multi-Spectroscopy Analysis and Molecular Docking. **Foods**, v. 11, n. 2764, p. 1–14, 2022.

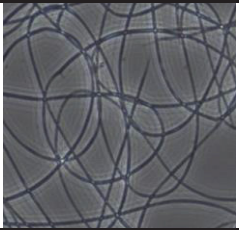
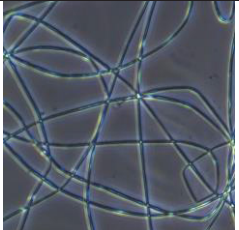
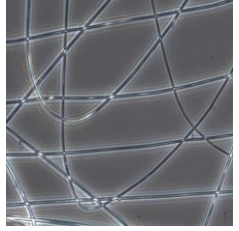
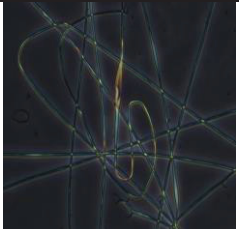
ZIAEI AMIRI, F. et al. Cell attachment effects of collagen nanoparticles on crosslinked electrospun nanofibers. **International Journal of Artificial Organs**, v. 44, n. 3, p. 199–207, 2020.

ZULHENDRI, F. et al. Antiviral, Antibacterial, Antifungal, and Antiparasitic Properties of Propolis: A Review Felix. **Foods**, v. 10, n. 1360, p. 1–29, 2021.

ZULLKIFLEE, N.; TAHA, H.; USMAN, A. Propolis: Its Role and Efficacy in Human Health and Diseases. **Molecules**, v. 27, n. 18, 2022.

Apêndice I

Imagens de microscopia óptica representativas das fibras obtidas segundo os parâmetros indicados (solvente e condição de eletrospinação). As características avaliadas foram: o diâmetro das fibras e seu formato, a presença de *beads* e o rendimento.

Concentração de zeína	Solvente	Condição	Características*	Imagem (40x)
Zeína 25%	Etanol 70	0,2 mL h ⁻¹ , +10 kV, 15 cm	0,89 μm, <i>beads</i> +, curvas e longas, rendimento +++	
	Etanol 90	0,2 mL h ⁻¹ , +8 kV, 15 cm	1,18 μm, <i>beads</i> +, Fibras irregulares, rendimento ++	
Zeína 30%	Etanol 70	0,2 mL h ⁻¹ , +10 kV 15 cm	1,24 μm, <i>beads</i> +, fibras não tão curvas, longas, rendimento +++	
	Etanol 90	0,2 mL h ⁻¹ , + 8 kV, 15 cm	1,43 μm, <i>beads</i> +, não tão curvas, longas, pouco irregulares, rendimento ++	

*Classificação por cruzes: *Beads* - (+) para raros, (++) para poucos, (+++) para muitos; Rendimento - baixo (+), bom (++) , ótimo (+++)

Anexo I – Informações acadêmicas

DISCIPLINA	PERÍODO	CRÉDITOS	CONCEITO
SEMINÁRIOS D1 – A	2/2018	1	B
COLÓIDES E QUÍMICA DE SUPERFÍCIES - A	2/2018	4	A
PRÁTICA DE DOCÊNCIA EM QUÍMICA - A	1/2019	1	A
MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS DE CARACTERIZAÇÃO DE MACROMOLÉCULAS E COLOIDES	1/2019	4	A
CULTIVO CELULAR	02/2019	3	B
MÉTODOS ANALÍTICOS DE SEPARAÇÃO	1/2020	4	A
SEMINÁRIOS D2 – A	2/2020	1	A
FÍSICO-QUÍMICA AVANÇADA	2/2020	4	A
TOTAL DE CRÉDITOS		19	

Obs.: Foram validados 18 créditos referente ao mestrado em Química concluído em 03-2016 pela Universidade Regional de Blumenau (FURB). Os créditos referentes à disciplina de cultivo celular não foram integralizados.

Doutorado Sanduíche

Bolsista CAPES-PRInt em Doutorado Sanduíche no exterior processo de número 88887.371645/2019-00.

Período da bolsa: 01/11/2019 a 28/02/2020

Instituição de ensino: Instituto de Nanotecnologia CNR – Nanotec, na cidade de Lecce – Itália

Orientadora: Loretta del Mercato

Participação em Projetos de Extensão

Ministrante do módulo intitulado “Princípios de físico-químicos de emulsões na área de cosméticos”, perfazendo um total de 10 horas/aula, do Curso de Extensão em Cosmetologia e Tecnologia de Cosméticos, sob coordenação do professor Dr. Rilton Alves de Freitas ofertado pela Universidade Federal do Paraná.

Participação em Semanas acadêmicas

Participação nas sessões coordenadas da V Semana da Pós-Graduação em Química e XXV Semana Acadêmica do Curso de Química da FURB (2021) sob coordenação da Professora Dra. Iêda Maria Begnini intitulada “Desenvolvimento de nanofibras de zeína e própolis de abelha nativa brasileira pela técnica de electrospinning”.

Participação em Minicursos

"Characterization of nanostructures and organized systems" (12 h) como atividade prévia ao "7th Meeting on Self Assembly Structures in Solution and at Interfaces held from September" – AutoOrg 2022 que ocorreu nos dias 22 e 23 de outubro de 2022.

Premiações

Melhor Poster: “Thermally Annealed Zein-Propolis Electrospun Nanofibers for Biomedical Applications” Apresentado no AutoOrg 2022 – Pôster premiado pela ACS Publications

Anexo II – Produção Científica

Artigos publicados:

MORAIS, R. P. Hochheim, S. de Oliveira, Carolina C., Riegel-Vidotti, Izabel C., Marino, Cláudia E.B.. Skin interaction, permeation, and toxicity of silica nanoparticles: Challenges and recent therapeutic and cosmetic advances. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 614, n. December 2021, 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121439>

Preparation and Investigation of Thermally Annealed Zein-Propolis Electrospun Nanofibers for Biomedical Applications. DOI 10.1002/mabi.202200524.

Sabrina Hochheim, Loretta L. del Mercato, Eliana D'Amone, Naiara M. F. M. Sampaio, Bruno José Gonçalves da Silva, Cyro Ketzer Saul, Anderson Fraga da Cruz, Carolina Camargo de Oliveira e Izabel Riegel-Vidotti

Apresentação em eventos na forma de Posteres:

1) Poster apresentado no 15° CBPol



ENCAPSULAÇÃO DE PRÓPOLIS PELA TÉCNICA DE COACERVAÇÃO COMPLEXA UTILIZANDO ÁCIDOS GRAXOS OBTIDOS DE RESÍDUOS DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS



Sabrina Hochheim*, Guilherme O. A. Cruz, Bruno C. da Silva,
Naiara M. F. M. Sampaio, Bruno J. G. da Silva, Izabel C. Riegel-Vidotti

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, PR Sabrina.hochheim@hotmail.com

Introdução

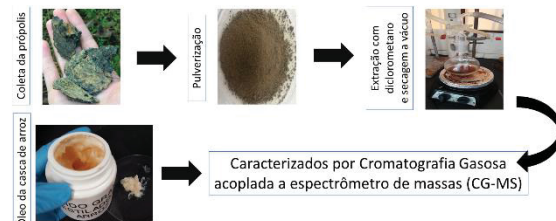
A própolis é conhecida como uma substância resinosa, heterogênea e com alta complexidade química, produzida pelas abelhas a partir dos exsudatos que elas coletam de diversas plantas ^{1,2}.

Devido ao interesse terapêutico na própolis, a técnica de coacervação complexa (CC) foi utilizada método de encapsulação, e, assim, contribuir para a melhora da solubilidade dos seus constituintes de baixa polaridade e proteção contra a oxidação. Na CC para finalidades biomédicas o uso de polímeros naturais, como a goma arábica (GA) e a gelatina, e atóxicos é especialmente útil ^{3,4}.

Utilizou-se como veículo o óleo de casca de arroz, obtido de resíduos da indústria de alimento, para formar a miniemulsão contendo própolis a ser encapsulada.

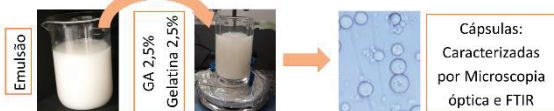
Experimental

1. Obtenção e Caracterização do extrato de própolis



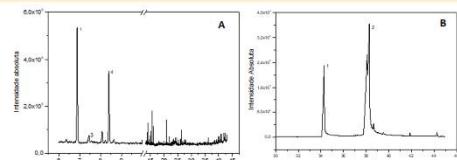
2. Emulsão e Coacervação Complexa

Emulsão	Span 60	CTAB	Óleo de arroz	Própolis	Água
1	1 mmol L ⁻¹	-	0,8g	0,21g	80 mL
2	-	3 mmol L ⁻¹	0,8g	0,21g	80 mL
3	1 mmol L ⁻¹	2 mmol L ⁻¹	0,8g	0,21g	80 mL



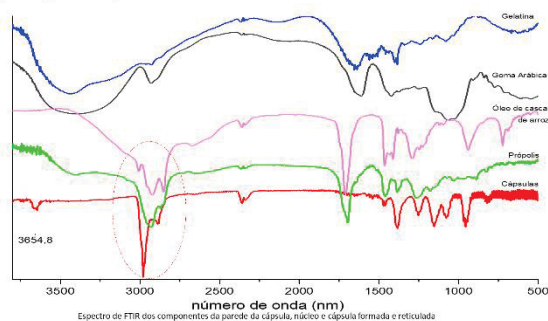
A reação é feita 40°C, o pH ajustado para 4,0 e a reticulação é feita com glutaraldeído a 10°C e pH 8,0

Resultados e Discussão



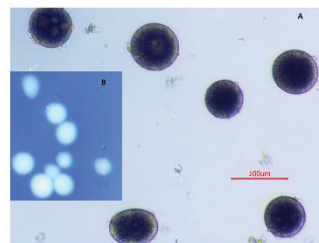
A: Cromatograma obtido por CG-MS da própolis e B: do óleo da casca de arroz

A análise cromatográfica da própolis revelou a presença de terpenos como o α -pineno (1), canfeno (3), β -pineno (4), verbenona, cariofileno, cubebeno, copaeno, elemol, espatulenol, rosifoliol, epimanoal, ferruginol, dentre outros. No cromatograma do óleo da casca de arroz foram identificados dentre os seus componentes mais significativos, o ácido palmítico (1) e ácido oleico (2).



Espectro de FTIR dos componentes da parede da cápsula, núcleo e cápsula formada e reticulada

No espectro de FTIR nota-se a presença das bandas próximas a 2916 e 2844 cm⁻¹ e em 1712 cm⁻¹ que apareceram tanto no óleo da casca de arroz como na própolis. Estas continuam presentes no espectro das cápsulas apresentando leves deslocamentos, demonstrando que houve a sua incorporação pelas cápsulas sem modificação de suas estruturas. A banda destacada em 3654 cm⁻¹ é referente à reticulação dos grupamentos -NH da gelatina pelo glutaraldeído.



A: Microscopia óptica das cápsulas de goma arábica/gelatina
B: Observadas sob luz polarizada. Barra de escala: 100 μ m.

As cápsulas possuem formato esférico, com paredes bem definidas e contínuas e uma estrutura multinuclear. Seus tamanhos variam de 119 μ m \pm 45 μ m. É possível observá-las sob luz polarizada, comprovando visualmente a incorporação da emulsão de própolis e óleo da casca de arroz.

Conclusão

A GA e gelatina são capazes de encapsular, pela técnica de CC, a fase óleo sob estudos. Houve necessidade do uso de dois surfactantes para a estabilização da emulsão e incorporação do núcleo. É desejado que as cápsulas alcancem um tamanho menor do que 1 μ m, para isso, este estudo está sendo otimizado. Estudos biológicos *in vitro*, de estabilidade e liberação do conteúdo, e rigidez da parede da cápsula estão sob estudos.

Referências

- Santos L, Hochheim S, Boeder AM, et al. *J Apic Res.* 2017, 56(5):543-558.
- Hochheim S, Guedes A, Faccin-Galhardi L, et al. *Rev Bras Farmacogn.* 2019.
- Landfester K, Musyanovych A, Mailla V. *J Polym Sci.* 2010, 48:493-515.
- Silva BC da, Riegel-Vidotti, IC, et al. *Food Hydrocoll.* 2015, 46:201-207.
- Hecht LL, Wagner C, Özcan Ö, et al. *Macromol Chem Phys.* 2012, (20):2165-2173.

Agradecimentos



2) Apresentação no AutoOrg 2022 – Pôster premiado pela ACS Publications



THERMALLY ANNEALED ZEIN-PROPOLIS ELECTROSPUN NANOFIBERS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

S. Hochheim^a, L. L. del Mercato^b, E. D'Amone^b, N. M. F. M. Sampaio^a, B. J. G. da Silva^a, C. K. Sauf^a, A. F. da Cruz^d, C. C. de Oliveira^d and I. Riegel-Vidotti^a

^a Department of Chemistry, Universidade Federal do Paraná, Brazil; ^b Institute of Nanotechnology, CNR/NANOTEC, Italy; ^c Department of Physics, Universidade Federal do Paraná, Brazil; ^d Department of Cell Biology, Universidade Federal do Paraná, Brazil

Background

Zein, a corn-derived protein, has a variety of promising applications ranging from drug delivery to tissue engineering and wound healing. This work aimed to develop a biocompatible scaffold for dermal applications based on electrospun propolis-loaded zein nanofibers. Fibers were prepared using 30% (w/v) of zein in ethanol 90% (v/v). Next, a rich-terpene propolis extract was loaded at different concentrations (5, 10, 15, 20 and 25% proportional to zein mass) and the produced scaffold was studied.

Experimental

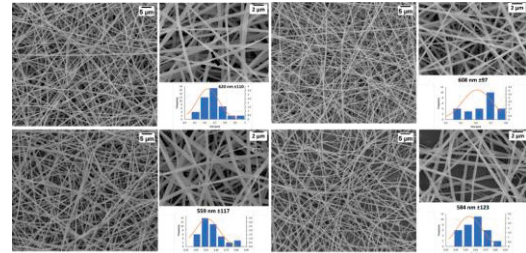
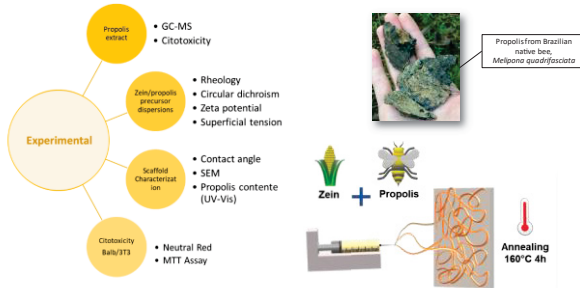


Fig 2: SEM images and fiber diameter distributions after annealing at 160°C for 4h of z30; z30p5, z30p15 and z30p25.

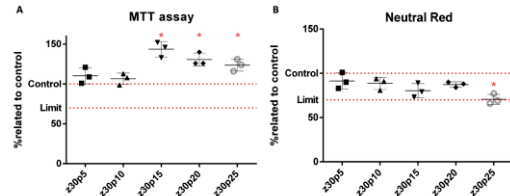


Fig 3: Cell viability of Balb/3T3 A. through MTT and B: through NR assay against 30% zein fibers (z30) in different proportions of 5 to 25% propolis.

Results

Table 1. Zeta potential of zein 30% (z30) and zein/propolis dispersions in different proportions from 5 to 25% in ethanol 90% (v/v)

Sample	z30	z30p5	z30p10	z30p15	z30p20	z30p25
ζ (mV)	9.77	10.17	11.75	11.15	12.48	12.35

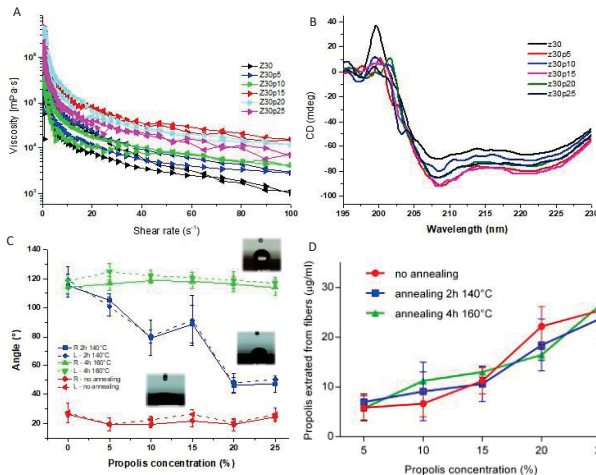


Fig. 1: **A:** Viscosity of zein solutions prepared with different propolis concentrations in ethanol 90% as a function of shear rate (01 to 100 s⁻¹); **B:** Circular dichroism spectra of zein (1 mg/mL) and different propolis concentration in ethanol 90%; **C:** Contact Angle (Right & Left) formed between ultrapure water and fibers with 30% zein with different propolis concentrations without annealing, after 2h annealing at 140°C, and 4h at 160°C; **D:** Propolis content in fibers before and after annealing as a function of propolis concentration (5 to 25%) added to the starting solution.

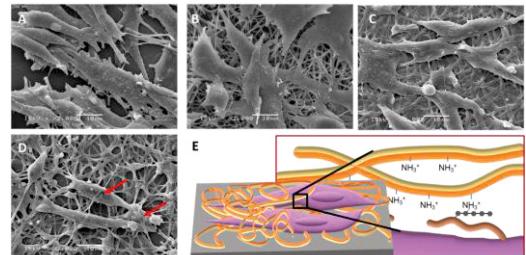


Fig 4: SEM images of Balb/3T3. Cultured in A: coverslip; B: z30; C: z30p15; D: Z30p25; E: schematic representation of cell adhesion mechanism between zein-propolis nanofibers positively charged and cell membrane.

Conclusion

Zein and propolis formed a viscoelastic solution. Due to zein and propolis characteristic interactions, nanometric size ribbon-like fibers ranging from 450 to 780 nm presenting interesting surface properties were obtained. The fibers proved to be biocompatible and capable of influencing cell morphology in 3D environment. The results are very promising and provide prospects for developing wound healing nanofiber patches - one of propolis' main application.

References

- Santos L, Hochheim S, Boeder AM, et al. *J Apic Res.* 2017, 56(5):543-558.
- Hochheim S, Guedes A, Faccin-Galhardi L, et al. *Rev Bras Farmacogn.* 2019.
- Moradkhannejhad, L. et al. *J. of Materials Science: Materials in Medicine* (2018) 29:165

Acknowledgments

