



DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE QUITOSANA CONTENDO PRÓPOLIS POR ENCAPSULAÇÃO

Jéssica C. Pereira^{1*}, Gustavo D. Urueña¹, Wanderley P. de Oliveira², Rodrigo Schneider³, Clovis Wesley O. de Souza⁴, Mônica L. Aguiar⁵, Alessandra A. Lucas¹

- 1 – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), Departamento de Engenharia de Materiais (DEMa), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Rodovia Washington Luís, km 235, São Carlos, CEP 13565-905, SP. jessica.pereira@estudante.ufscar.br
2 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).
3 – Departamento de Química (DQ), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).
4 – Departamento de Morfologia e Patologia (DMP), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).
5 – Departamento de Engenharia Química (DEQ), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

RESUMO

Formulações de quitosana e própolis foram estudadas com base em parâmetros físico-químicos ideais, sendo as micropartículas sintetizadas pelo método de gelatinização ionotrópica. Propriedades físicas como tamanho de partícula, potencial zeta, índice de polidispersividade, eficiência de encapsulamento foram investigadas, bem como a morfologia das partículas. Por meio da técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), foi possível observar tamanhos médios de partículas de aproximadamente 400nm. Foram alcançadas eficiências de encapsulação em torno de 75%, indicando sucesso na incorporação da própolis em quitosana. Os resultados deste trabalho se mostram promissores para a fabricação de micropartículas contendo própolis para posterior incorporação em matrizes funcionais.

Palavras-chave: *Própolis; Quitosana; Micropartículas; Encapsulação.*

INTRODUÇÃO

Diversos estudos mostram a eficiência de nanopartículas inorgânicas como prata, cobre e zinco como agentes antimicrobianos⁽¹⁻³⁾. Entretanto, extratos de produtos naturais como sal marinho⁴, extrato de toranja⁵, melaleuca⁶, entre outros, vem sendo cada vez mais estudados, pois além de apresentarem propriedades antimicrobianas, são considerados menos tóxicos que os agentes inorgânicos. Dessa forma, estes agentes biocidas e virucidas naturais podem apresentar aplicações interessantes, principalmente no que tange a saúde pública.

A própolis, resina naturalmente produzida pelas abelhas, é uma destas substâncias naturais com boas propriedades antivirais, antifúngicas, antibacterianas, anti-inflamatórias e antioxidantes, devido à considerável concentração de flavonóides em sua composição, que atuam na membrana celular dos microrganismos inibindo suas funções⁷. No entanto, a aplicação prática da própolis ainda é limitada devido à sua relativamente alta hidrofiliabilidade e forte aroma. Dessa forma, a microencapsulação surge como potencial alternativa para envolver a própolis, permitindo mascarar suas propriedades sensoriais indesejáveis, evitar aglomerados e aumentar sua área superficial ativa, proporcionando uma maior eficácia contra os patógenos.

A quitosana, polissacarídeo derivado da N-desacetilação da quitina, é considerada um interessante biopolímero natural para a produção de nanocápsulas devido a sua biodegradabilidade, biocompatibilidade, não-toxicidade e mucoadesão, propiciada pelo grande número de hidroxilas e grupos amino presentes em sua cadeia polimérica^(8,9).

No intuito de produzir nano e micropartículas, o método de gelificação ionotrópica se mostra uma boa alternativa. Nesta técnica, interações eletrostáticas entre a quitosana catiônica (grupos amina protonados) e um agente reticulante poliânion, como o tripolifosfato (TPP) resultam em complexos polieletrólíticos (PEC)¹⁰. As estruturas gelatinosas resultantes, geralmente apresentam formato esférico com dimensões nanométricas, e apresentam afinidade com uma série de compostos com grupos polares ou carregados¹¹.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de micropartículas de própolis encapsuladas em quitosana, bem como a avaliação do caráter biocida dessas microcápsulas, a fim de avaliar seu potencial de aplicação em matrizes funcionais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Extrato de própolis verde padronizado 17%, quitosana comercial (peso molecular 336.100 g/mol e grau de desacetilação de 71%), tripolifosfato de sódio (TPP) (peso molecular 367,86g/mol), ácido acético glacial (peso molecular 60,05 g/mol).

Síntese das suspensões de nanopartículas

As nanopartículas foram obtidas utilizando o procedimento de gelatinização ionotrópica com modificações. Inicialmente, a quitosana foi solubilizada em ácido acético 1%, obtendo-se uma solução de quitosana 0,5%, que foi mantida sob agitação por 24h para completa solubilização. Extratos de própolis (0,5-1,5 mg/ml) foram gotejados lentamente no gel de quitosana, e a nova solução foi mantida sob agitação por 1h. Em seguida, o tripolifosfato (TPP) foi solubilizado em água destilada, numa concentração de 0,5%, e adicionado à solução de quitosana-própolis via *drop wise* (gotejamento lento e contínuo) sob agitação vigorosa. Após adição do TPP, a suspensão foi mantida sob agitação por 30min e posteriormente sonicada por 30min. Além da variação da concentração do extrato de própolis, também foi variada a razão entre quitosana e TPP (2:1, 3:1, 4:1, 5:1). As suspensões foram armazenadas em recipientes de vidro e sonicadas por 10min antes das caracterizações. Para as etapas de sonicação, foi utilizado o equipamento Elmasonic S 60(H), com 37 kHz de frequência e 150W de potência efetiva.

Determinação do tamanho de partícula e Potencial Zeta

A estabilidade das partículas em uma suspensão é afetada pelo seu Potencial Zeta. Conforme a magnitude do Potencial Zeta aumenta, a repulsão eletrostática entre as partículas se torna maior, levando a uma suspensão mais estável. Para a determinação dos Potenciais Zeta de cada suspensão, bem como seus tamanhos médios de partículas e respectivos índices de polidispersividade, as amostras foram analisadas no sistema Zeta Potential Analyzer ZetaSizer Nano ZS ZEN 36000 (Malvern Instruments). As medidas foram realizadas em triplicata.

Determinação da Eficiência de Encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação, é preciso quantificar os flavonóides totais presentes no extrato de própolis, e os flavonóides presentes nos sobrenadantes das amostras após centrifugação. Para isso, utilizou-se o método descrito por Woisky & Salatino (1998)¹², em que o conteúdo de flavonóides totais é determinado usando uma curva padrão de quercetina. A partir da equação da reta obtida da curva padrão e dos valores de absorbância obtidos por espectroscopia UV-Vis (Varian, Cary 50 UV-Visible Spectrophotometer) das amostras (leituras feitas em $\lambda=425\text{nm}$, em triplicata), obtém-se o teor de flavonóides totais, expresso em mg de quercetina por g de própolis. Uma vez obtido o conteúdo de flavonóides, é possível estimar a quantidade de própolis incorporada nas partículas de quitosana, pelo cálculo da Eficiência de Encapsulação (EE%), de acordo com a Equação (A), onde C_t é a concentração de flavonóides totais e C_s a concentração de flavonóides livres no sobrenadante:

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

Caracterização Morfológica

A morfologia das partículas obtidas foi observada por microscopia eletrônica de varredura (Philips XL-30 FEG). Uma gota da suspensão de partículas foi depositada sobre uma fita metálica disposta no porta amostras, e deixada em dessecador por 24 horas para completa remoção do solvente. A amostra foi recoberta com ouro, e a análise foi realizada em modo de detecção SE (elétrons secundários) com voltagem de 5kV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Oito diferentes formulações foram preparadas conforme descrito na metodologia, e cada formulação foi nomeada de acordo com a razão quitosana:TPP seguida da concentração do extrato de própolis. Estas formulações foram caracterizadas com base na obtenção dos tamanhos médio de partículas, índice de polidispersividade, Potencial Zeta e eficiência de encapsulação, e os resultados se encontram na Tabela 1.

Tabela 1: Tamanho médio de partículas, índice de polidispersividade (PDI), Potencial Zeta e eficiência de encapsulação para cada formulação.

Formulação	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	EE (%)
2:1 0,05	771,17 ± 120,83	0,58 ± 0,11	15,93 ± 0,15	81,21 ± 0,52
3:1 0,05	332,75 ± 27,22	0,34 ± 0,07	31,7 ± 0,98	67,95 ± 1,24
4:1 0,05	484 ± 48,69	0,25 ± 0,26	36,2 ± 4,78	71,42 ± 0,50
5:1 0,05	496,32 ± 39,21	0,41 ± 0,08	39,2 ± 1,23	65,41 ± 0,54
2:1 0,15	836,53 ± 162,42	0,75 ± 0,32	13,73 ± 0,67	79,25 ± 0,27
3:1 0,15	392,55 ± 15,03	0,43 ± 0,06	29,47 ± 0,68	78,06 ± 0,10
4:1 0,15	457,04 ± 17,78	0,32 ± 0,04	41,17 ± 2,93	75,56 ± 0,18
5:1 0,15	510,25 ± 76,03	0,24 ± 0,12	35,4 ± 3,11	71,90 ± 1,18

É possível observar que, conforme a concentração de quitosana, com relação ao TPP aumenta (amostras 3:1, 4:1, 5:1), o tamanho das partículas também aumenta. Isso pode ser atribuído à maior densidade de grupos amino protonados da quitosana disponíveis para interação com o TPP, conforme a quantidade de quitosana aumenta. As amostras de razão 2:1 (2:1 0,05 e 2:1 0,15) apresentaram os maiores tamanhos de partículas, possivelmente resultado de aglomerados

de partículas, devido à instabilidade da suspensão, corroborado pelos respectivos valores de potencial Zeta (+15,93mV e +13,73mV). As demais amostras, de razões 2:1, 3:1 e 4:1, apresentaram valores de potencial Zeta superiores a +30mV, indicando suspensões estáveis. O índice de polidispersividade é um indicador da distribuição do tamanho das partículas. Com exceção da amostra 2:1 0,15, cujo PDI foi de 0,75, as demais formulações apresentaram PDI que variaram de 0,24 até 0,58, sugerindo uma monodispersividade, ou seja, pouca variação no tamanho das partículas.

Todas as amostras apresentaram altos valores de eficiência de encapsulação, acima de 65%, indicando que a própolis foi incorporada nas cápsulas de quitosana com sucesso. As amostras de razão 2:1 apresentaram os maiores valores de eficiência de encapsulação, possivelmente devido ao seu maior tamanho.

Baseado em todos estes parâmetros, a amostra 3:1 0,15 mostrou ser a com a formulação mais promissora, apresentando uma boa relação entre tamanho de partículas ($392,55 \pm 15,03$) e eficiência de encapsulação ($78,06 \pm 0,10$), quando comparada com as demais.

A morfologia das partículas de quitosana contendo própolis de formulação 3:1 0,15 foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (Figura 1).

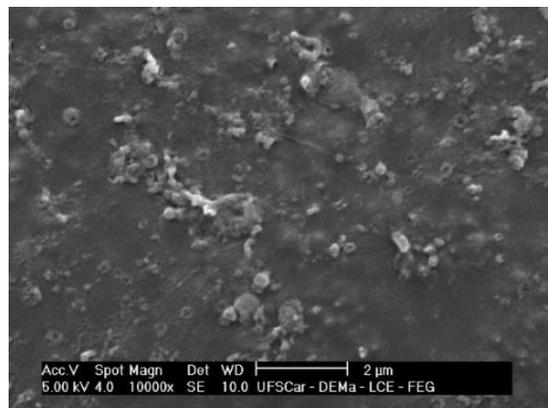


Figura 1: Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das partículas de quitosana com própolis.

Conforme observado na microscopia, as cápsulas apresentam formato aproximadamente esférico. A presença de alguns aglomerados de partículas pode ser decorrente do valor do potencial Zeta da suspensão ($29,47 \pm 0,68$), em que, considerando seu desvio padrão, pode apresentar valores inferiores a +30mV, e, portanto, apresentar certa instabilidade, e conseqüentemente, partículas que se atraem e aglomeram.

CONCLUSÕES

A utilização do método de gelificação ionotrópica para incorporação de própolis em quitosana se mostrou um processo eficiente para a obtenção de partículas submicrométricas com elevada eficiência de encapsulação. A amostra com formulação que apresenta uma razão entre a quitosana catiônica e o poliânion TPP de 3:1, com 0,15% de extrato de própolis, apresentou tamanho médio de partículas de $392,55 \pm 15,03$ nm, PDI de $0,43 \pm 0,06$, potencial Zeta de $+29,47 \pm 0,68$ mV, e EE% de $78,06 \pm 0,10$ %, indicando ser uma potencial formulação de partida para a síntese de partículas contendo própolis para futura incorporação em matrizes funcionais com atividade antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Os autores também agradecem à CAPES pela concessão de bolsa (Processo: 88887.511896/2020-00) e pelo financiamento do projeto que faz parte do Programa de Combate a Epidemias (Processo: 88887.505019/2020-00). Agradecem também ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM-UFSCar), pela possibilidade de desenvolvimento do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. TREMILIOSI, G. C., SIMOES, L. G. P., MINOZZI, D. T., et al. Ag nanoparticles-based antimicrobial polycotton fabrics to prevent the transmission and spread of SARS-CoV-2. *bioRxiv*, p. 2020.06.26.152520, 2020.
2. CHAUDHARY, J., TAILOR, G., KUMAR, D., et al. Synthesis and Thermal Properties of Copper Nanoparticles. *Asian Journal of Chemistry*, v. 29, n. 8, p. 1757–1760, 2017.
3. GUDKOV, S. V., BURMISTROV, D. E., SEROV, D. A., et al. A Mini Review of Antibacterial Properties of ZnO Nanoparticles. *Frontiers in Physics*, v. 9, p. 1–12, 2021.
4. JEONG, S. Bin, HEO, K. J., LEE, B. U. Antimicrobial Air Filters Using Natural Sea Salt Particles for Deactivating Airborne Bacterial Particles. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 17, 2020.
5. HAN, B., KANG, J., KIM, H., et al. Investigation of Antimicrobial Activity of Grapefruit Seed Extract and Its Application to Air Filters with Comparison to Propolis and Shiitake. *Aerosol and Air Quality Research*, v. 15, p. 1035–1044, 2015.
6. HUANG, R., PYANKOV, O. V., YU, B., et al. Inactivation of fungal spores collected on fibrous filters by melaleuca alternifolia (Tea Tree Oil). *Aerosol Science and Technology*, v. 44, n. 4, p. 262–268, 2010.
7. CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n. 5, p. 343–356, 2005.
8. NATRAJAN, D., SRINIVASAN, S., SUNDAR, K., et al. Formulation of essential oil-loaded chitosan e alginate nanocapsules. *Journal of Food and Drug Analysis*, p. 1–9, 2015.
9. HU, X., WANG, Y., PENG, B. Chitosan-Capped Mesoporous Silica Nanoparticles as pH-Responsive Nanocarriers for Controlled Drug Release. *Chem. Asian J.*, v. 9, p. 319–327, 2014.
10. AHMADI, Z., SABER, M., AKBARI, A., et al. Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 161, p. 111–119, 2018.
11. PATIL, P., CHAVANKE, D., WAGH, M. A review on ionotropic gelation method: Novel approach for controlled gastroretentive galispheres. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 4, 2012.
12. WOISKY, R. G., SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-PROPOLIS MICROPARTICLES BY ENCAPSULATION

ABSTRACT

Chitosan and própolis formulations were studied based on ideal physicochemical parameters, in which microparticles were synthesized by ionotropic gelation method. Physical properties such as particle size, zeta potential, polydispersity index, encapsulation efficiency were investigated, as well as the particle morphology. Using dynamic light scattering (DLS)

technique, it was possible to observe average particle size around 400nm. Encapsulation efficiencies around 75% were achieved, indicating that the incorporation of propolis into chitosan was successful. The results of this work are promising for the obtention of propolis microparticles for later incorporation into functional matrices.

Keywords: *Propolis; Chitosan; Microparticles; Encapsulation.*